

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Caraterização do perfil antioxidante de cianobactérias e seleção de estirpes com potencial biotecnológico

Adriana Soares Guerreiro

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Elsa Dias
Prof. Doutora Teresa Rebelo

2019

Nota prévia

Esta dissertação contou com a co-orientação da Mestre Carina Menezes, do Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, do Departamento de Saúde Ambiental e da Mestre Fernanda Vilarinho e Mestre Mariana Andrade, da Unidade de Referência do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da revista *Food Bioscience*. A escrita desta dissertação segue as regras do novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi apresentado nas seguintes comunicações:

Guerreiro, A., Andrade, M., Menezes, C., Vilarinho, F., Silva, J. A., & Dias, E. (2019). Screening of the antioxidant activity of LMECYA cyanobacterial strains. *2º Congreso Iberoamericano de Cianotoxinas*. 3 – 5 de Julho, Murcia, Espanha (comunicação em forma de painel) (Anexo I).

Guerreiro, A (2019). Caracterização do perfil antioxidante de cianobactérias e seleção de estirpes com potencial biotecnológico. Encontros do Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (comunicação oral).

Um artigo com os resultados da tese será submetido para publicação, até 31 de dezembro, ao volume especial da revista *Toxins* “Selected papers from the 6th Iberian and 2nd Ibero-American Cyanotoxin Congress CIC2019”.

Dedicatória e agradecimentos

É-me difícil colocar em palavras toda a minha gratidão e reconhecimento para com tudo e todos os que, direta e indiretamente, me acompanharam e contribuíram para a realização desta dissertação. Estou desde já imensamente agradecida pela companhia, disposição, força, entusiasmo e compreensão de todos os envolvidos. No entanto, há claramente quem se destaque.

Em primeiro lugar quero expressar o mais profundo agradecimento e orgulho que tenho na minha família, especialmente aos meus pais, por sempre terem acreditado em mim e nunca me terem cortado as asas e de estarem ao meu lado em tudo o que faço. É devido a eles que cá estou hoje e que tenho a oportunidade de viver esta experiência que é a vida académica e a realização de uma dissertação. Obrigada por trabalharem ao máximo para permitir que eu e a minha irmã tenhamos tudo o que precisamos (e queremos).

De seguida gostaria de agradecer ao Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pois de uma maneira ou de outra, todos estiveram envolvidos.

À minha orientadora externa Doutora Elsa Dias, por, em primeiro lugar, me ter acolhido nesta aventura e por ter sido incansável durante todo o processo. É uma pessoa extremamente compreensiva e sempre disposta a ajudar, mesmo em momentos e situações mais complicadas. Obrigada por todo o cuidado e atenção depositados neste trabalho. Sinto-me uma privilegiada por ter tido a oportunidade de a ter como minha mentora/orientadora.

À Mestre Carina Menezes por, mesmo não podendo ter sido a minha orientadora, ter feito uma grande parte desse papel e ter estado sempre presente e determinada a ajudar e a esclarecer qualquer dúvida tanto em relação a trabalho teórico como prático. Tenho a certeza de quando puder ter a oportunidade de orientar uma dissertação, será uma orientadora impecável.

Ao Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por terem permitido a minha “intrusão” e uso das suas instalações.

À Mestre Fernanda Vilarinho por se ter mostrado interessada neste projeto desde o início e por ter sido extremamente carinhosa comigo. Obrigada pela constante e contagiante boa disposição, indispensável para levar este trabalho em frente.

À Mestre Mariana Andrade, pela, e não posso frisar isto o suficiente, vital paciência e perseverança durante este processo. É uma pessoa sem a qual esta dissertação não teria sido feita. Obrigada também pela boa disposição e alegria e por transformares o laboratório praticamente numa segunda casa, onde todos os dias havia música para acompanhar o trabalho.

À Doutora Maria Teresa Rebelo, por ter aceitado o papel de minha orientadora interna da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e por todos os conselhos, sugestões e esclarecimentos fornecidos.

Um enorme agradecimento à minha colega de mestrado e laboratório Marta Reis, por estar comigo desde o início desta aventura e de ainda permanecer nela no seu fim. A sua presença foi e ainda é essencial para este trabalho. Obrigada pela tua companhia e disponibilidade, nem que seja para ouvir as minhas lamentações, frustrações e também vitórias. Um dia no laboratório era um dia bem passado a partir do momento em que e as tuas cantorias lá estivessem.

Obrigada a todos do mestrado em Biologia Humana e Ambiente que irão ficar na minha vida para sempre, nomeadamente a Rita Simão, a Beatriz Oliveira e o André Costa. Tornaram todas as pausas de trabalho em momentos de risada, alegria e boa disposição. Estiveram presentes para todas as dúvidas, mais ou menos científicas, e para todos os momentos de desespero.

Obrigada também aos meus amigos e amigas, para além dos meus colegas de mestrado, por me terem acompanhado no desenvolvimento deste trabalho e por terem sido extremamente compreensíveis quando não puder estar presente em determinados momentos em conjunto.

Abstract

Cyanobacteria are prokaryotic photosynthetic organisms that show great diversity in their morphology, physiology and metabolism. They are an abundant group on planet Earth, with high adaptability and survival and are found in habitats with varied and even extreme environmental conditions. Cyanobacteria produce secondary metabolites (fatty acids, carotenoids, vitamins, toxins, among others), which exhibit various types of bioactivity with biotechnological potential, namely antioxidant activity. An antioxidant is defined as an agent with the ability to break or prevent the proliferation of lipid oxidation reactions, which occurs naturally in tissues. In the food industry, compounds with this activity are important because they delay and / or inhibit food degradation. However, some of the commercially available synthetic antioxidants are suspected to have carcinogenic activity and to be toxic to humans. Therefore, it is of great importance to identify natural sources of compounds with antioxidant activity.

This work aimed to evaluate the antioxidant profile of cyanobacterial strains isolated from freshwaters. Ethanolic and methanolic extracts of eight strains of cyanobacteria (*Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Leptolyngbya sp.*, *Anabaena flos-aquae*, *Planktothrix mougeotii*, *Nostoc sp.* and *Planktothrix agardhii*) were prepared and their antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical inhibition system assay and the β -carotene bleaching assay. The total content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu assay and the total flavonoid content by the aluminum chloride assay. Antioxidant profiles varied with strain and extraction solvent. The ethanolic extracts of *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) and *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) showed the highest values in the β -carotene bleaching assay (690,47 and 828,94 AAC respectively) and in the total content of phenolic (102,32 and 123,16 mg EAG/g of extract respectively) and flavonoid (605,58 and 900,60 mg EQR/g of extract, respectively) compounds. The methanolic extracts of *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) and *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) showed the highest inhibition percentage of DPPH radical (10,65%, 10,20% and 10,59%, respectively).

In this work, the protective effect of the ethanolic extracts of the eight strains against H_2O_2 -induced cytotoxicity in the HEK293T human cell line was also evaluated by the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium tetrazolium (MTT) assay. Pre-exposure of these cells to all extracts provided protection against H_2O_2 , especially *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) and *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), which gave the H_2O_2 treated cells a survival rate of 47%, 25% and 53%, respectively in an one hour exposure to the extracts and twenty three hours exposure to the H_2O_2 , relative to the cells exposed only to H_2O_2 .

From the cyanobacteria studied, the strains *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) and *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) were selected as the most promising for future studies on biotechnological applications in the field of antioxidants.

Key words: cyanobacteria, antioxidant, biotechnological potential, phenolic compounds, flavonoids, DPPH

Resumo

As cianobactérias são organismos fotossintéticos procarióticos que apresentam grande diversidade em relação à sua morfologia, fisiologia e metabolismo. São um grupo abundante no planeta Terra, com elevada capacidade de adaptação e sobrevivência e são encontrados em habitats com condições ambientais variadas e até extremas. As cianobactérias produzem metabolitos secundários (ácidos gordos, carotenóides, vitaminas, toxinas, entre outros), que exibem vários tipos de bioatividade com potencial biotecnológico, designadamente atividade antioxidante. Um antioxidante é definido como um agente com a capacidade de quebrar ou impedir a proliferação de reações de oxidação lipídica, algo que ocorre naturalmente nos tecidos. Na indústria alimentar, os compostos com essa atividade são importantes porque atrasam e/ou inibem a degradação dos alimentos. No entanto, alguns dos antioxidantes sintéticos disponíveis no mercado são suspeitos de ter atividade carcinogénica e de serem tóxicos para os seres humanos. Portanto, é de grande importância identificar fontes naturais de compostos com atividade antioxidante.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antioxidante de estirpes de cianobactérias isoladas de águas doces. Prepararam-se extratos etanólicos e metanólicos de oito estirpes de cianobactérias (*Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Leptolyngbya sp.*, *Anabaena flos-aquae*, *Planktothrix mougeotii*, *Nostoc sp.* e *Planktothrix agardhii*) e a sua atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio do sistema de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e pelo ensaio de branqueamento do β -caroteno. Foi também determinado o conteúdo total em compostos fenólicos, pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu* e o conteúdo total em flavonóides pelo ensaio do cloreto de alumínio. Os perfis antioxidantes variaram com a estirpe e com o solvente de extração. Os extratos etanólicos de *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) apresentaram os valores mais elevados no ensaio de branqueamento β -caroteno (690,47 e 828,94 AAC respetivamente) e no conteúdo total de compostos fenólicos (102,32 e 123,16 mg EAG/g de extrato, respetivamente) e flavonóides (605,58 e 900,60 mg EQR/g de extrato, respetivamente). Os extratos metanólicos de *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) e *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) apresentaram a maior percentagem de inibição do radical DPPH (10,65%, 10,20% e 10,59%, respetivamente).

Neste trabalho foi também avaliado o efeito protetor dos extratos etanólicos das oito estirpes contra a citotoxicidade induzida por H_2O_2 na linha celular humana HEK293T através do ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio tetrazólio (MTT). A pré-exposição destas células a todos os extratos conferiram proteção contra o H_2O_2 , salientando-se os extratos das estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), que conferiram às células tratadas com H_2O_2 uma taxa de sobrevivência de 47%, 25% e 53%, respetivamente numa exposição de uma hora aos extratos e vinte e três horas ao H_2O_2 , em relação às células expostas apenas ao H_2O_2 .

Das cianobactérias estudadas, selecionaram-se as estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) como as mais promissoras para estudos futuros sobre aplicações biotecnológicas na área dos antioxidantes.

Palavras-chave: cianobactérias, antioxidante, potencial biotecnológico, compostos fenólicos, flavonóides, DPPH

Índice

Dedicatória e agradecimentos	i
Abstract	ii
Resumo.....	iii
Índice.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	x
1. Introdução.....	1
1.1. Cianobactérias: Origem e características.....	2
1.2. Ecologia e habitat das cianobactérias	4
1.3 Compostos bioativos de cianobactérias.....	5
1.3.1 Compostos fenólicos	6
1.3.2 Terpenóides	6
1.3.3 Lípidos.....	6
1.3.4 Pigmentos.....	7
1.3.5 Cianotoxinas.....	7
1.3.6 Outros	8
1.4 Atividade e perfil antioxidante de cianobactérias.....	9
1.4.1 Compostos fenólicos	10
1.4.2 Componentes lipófilos.....	14
1.4.3 Pigmentos.....	14
1.4.4 Compostos foto-protetores	14
1.5 Citoproteção e Citotoxicidade de cianobactérias.....	14
1.6 Potencial biotecnológico	15
1.6.1 Indústria alimentar.....	15
1.6.1.1 Nutrição humana	15
1.6.1.2 Nutrição animal	16
1.6.2 Indústria farmacêutica	17
1.6.3 Indústria cosmética.....	17
1.6.4 Indústria ambiental	17
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e métodos.....	21
3.1 Material biológico e produção de biomassa	22
3.1.1. Estirpes de cianobactérias.....	22

3.1.2. Caraterização morfológica	23
3.1.3. Quantificação celular.....	23
3.1.4. Curvas de crescimento.....	24
3.1.5 Produção de biomassa	24
3.1.6. Extração da biomassa	25
3.2 Caraterização do perfil antioxidante de cianobactérias	26
3.2.1 Ensaio do sistema de inibição do radical DPPH	26
3.2.2. Ensaio da determinação do conteúdo total em compostos fenólicos	26
3.2.3. Ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides.....	27
3.2.4. Ensaio do branqueamento do β -caroteno	27
3.3. Avaliação do efeito protetor de extratos cianobactérias em células HEK293T expostas a peróxido de hidrogénio.....	28
3.3.1 Exposição da linha celular HEK293T a extratos de cianobactérias e a H_2O_2	28
3.3.2. Ensaio do MTT.....	31
4. Resultados.....	33
4.1 Caraterização morfológica de cianobactérias e curvas de crescimento.....	34
4.2 Produção, recolha e extração de biomassa de cianobactérias.....	38
4.3 Ensaio para a determinação da atividade antioxidante	41
4.4 Efeito protetor de extratos de cianobactérias na linha celular HEK293T contra a citotoxicidade induzida por H_2O_2	45
5. Discussão.....	49
5.1 Caraterização das estirpes e produção de biomassa	50
5.2 Extração de biomassa	52
5.3 Avaliação do perfil antioxidante de estirpes cianobacterianas	53
5.4 Avaliação do efeito protetor de extratos de cianobactérias contra o efeito de H_2O_2 na linha celular HEK293T.....	57
6. Conclusão.....	58
7. Referências.....	60
8. Anexos.....	77
ANEXO I – Poster de comunicação em forma de painel	78
ANEXO II – Meio de cultura Z8 para cianobactérias	79
ANEXO III – Resultados preliminares da extração das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMACYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMACYA 088) e <i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224).....	80
ANEXO IV – Resultados preliminares da extração das estirpes <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMACYA 127), <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMACYA 173) e <i>Nostoc sp.</i> (LMACYA 291)	83

ANEXO V – Resultados dos extratos etanólicos e metanólicos das estirpes cianobacterianas em concentração de 1 mg/mL.....	86
---	----

Lista de figuras

Figura 1.1 - Diversidade morfológica em cianobactérias.....	2
Figura 1.2. - Corte transversal de uma célula cianobacteriana.....	3
Figura 1.3. - Estrutura de um ficobilissoma.....	7
Figura 1.4. – Grânulos de PHA, acumulados por <i>Spirulina platensis</i> , corados com azul de Nilo A..	9
Figura 1.5. - Representação da ação antioxidante dos lípidos por doação de elétrons simples.....	9
Figura 1.6. - Representação da função quelante dos antioxidantes lipídicos.....	10
Figura 1.7. – Diferença da pigmentação de um filete de truta alimentada com milho normal (esquerda) e um filete de truta alimentada com milho suplementado com astaxantina (direita).....	16
Figura 1.8. – Filme de PHA fundido a partir de solvente em que os grânulos de PHA foram dissolvidos	18
Figura 3.1. - Esquema da ordem de realização do trabalho experimental.....	22
Figura 3.2. - Câmaras utilizadas na contagem de células.....	24
Figura 3.3. Células HEK293.....	29
Figura 3.4. - Representação de células viáveis e não viáveis no método de exclusão do azul de tripano	29
Figura 3.5. - Representação de uma câmara de Neubauer e campo de contagem de células.....	29
Figura 4.1. – Características morfológicas das estirpes estudadas neste trabalho.....	35
Figura 4.2. – Curvas de crescimento construídas a partir da concentração celular de culturas.....	36
Figura 4.3. - Curvas de crescimento construídas a partir da absorvância de culturas.....	37
Figura 4.4. – Balões de crescimento de biomassa das estirpes de cianobactérias.....	39
Figura 4.5. – Ampolas de decantação da biomassa das cianobactérias.....	39
Figura 4.6. – <i>Pellets</i> formados pela biomassa das estirpes de cianobactérias após centrifugação....	40
Figura 4.7. - Amostra da estirpe <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173) antes (após congelamento) (à esquerda) e depois da liofilização (à direita).....	40
Figura 4.8. – Gráfico da percentagem de inibição (%) (a) e dos Equivalentes de Trolox (µg/mL) (b) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL.....	42
Figura 4.9. – Gráfico de Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g de extrato) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL.....	43
Figura 4.10. – Gráfico de Equivalentes de Quercetina (mg/g de extrato) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL.....	44
Figura 4.11. – Gráfico de Coeficiente de Atividade Antioxidante dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL.....	45
Figura 4.12. – Viabilidade (a) e sobrevivência (b) das células submetidas a uma curta exposição (1h) aos extratos etanólicos cianobacterianos e longa exposição (23h) a H ₂ O ₂ (0.1 mM).....	46
Figura 4.13. - Viabilidade (a) e sobrevivência (b) das células submetidas a uma longa exposição (23h) aos extratos etanólicos cianobacterianos e curta exposição (3h) a H ₂ O ₂ (1 mM).....	47
Figura 8.1 - Poster de comunicação em forma de painel.....	78

Lista de tabelas

Tabela 1.1. – Exemplos de compostos secundários bioativos produzidos por cianobactérias. (Fonte: Wada & Murata, 1998; Singh et al, 2017b).....	5
Tabela 1.2. - Classes de toxinas, toxinas e gêneros de cianobactérias produtoras das mesmas.....	7
Tabela 1.3. – Resultados de algumas investigações realizadas em cianobactérias em relação à sua atividade antioxidante e conteúdo em determinados compostos que contribuem para a mesma.....	11
Tabela 3.1. - Estirpes de cianobactérias utilizadas neste trabalho e código das mesmas.....	22
Tabela 3.2. - Condições de exposição das microplacas com células HEK293T aos extratos cianobacterianos e H ₂ O ₂	30
Tabela 3.3. - Esquema da exposição das microplacas com células HEK293T aos extratos cianobacterianos e H ₂ O ₂	30
Tabela 4.1. - Características morfológicas principais nas estirpes estudadas.....	34
Tabela 4.2. - Taxa de crescimento, tempo de duplicação, concentração celular máxima e rendimento da produção de biomassa das estirpes de cianobactérias.....	41
Tabela 4.3. - Rendimento (%) (p/p), das extrações de cianobactérias com os diferentes solventes...	41
Tabela 4.4. - Retas de calibração calculadas para os diferentes ensaios para a determinação da atividade antioxidante.....	41
Tabela 8.1. – Composição do meio Z8 para cultura de cianobactérias.....	79
Tabela 8.2. – Composição e concentração do meio de cultura Z8 para cianobactérias.....	79
Tabela 8.3. – Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos etanólicos das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088) e <i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224).....	80
Tabela 8.4. – Resultados do ensaio da determinação do conteúdo em fenólicos totais dos extratos etanólicos das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088) e <i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224).....	80
Tabela 8.5. – Resultados do ensaio da determinação do conteúdo em flavonóides totais dos extratos etanólicos das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088) e <i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224).....	81
Tabela 8.6. - Resultados do ensaio do branqueamento do β-caroteno dos extratos etanólicos das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088) e <i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224).....	81
Tabela 8.7. – Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos metanólicos das estirpes <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127), <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173) e <i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291).....	83
Tabela 8.8. - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo em fenólicos totais dos extratos metanólicos das estirpes <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127), <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173) e <i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291).....	83
Tabela 8.9. - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo em flavonóides totais dos extratos metanólicos das estirpes <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127), <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173) e <i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291).....	84
Tabela 8.10. - Resultados do ensaio do branqueamento do β-caroteno dos extratos metanólicos das estirpes <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127), <i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173) e <i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291).....	84
Tabela 8.11 - Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes <i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088), <i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127), <i>Leptolyngbya</i>	

sp. (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).....86

Tabela 8.12 - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em fenólicos dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).....87

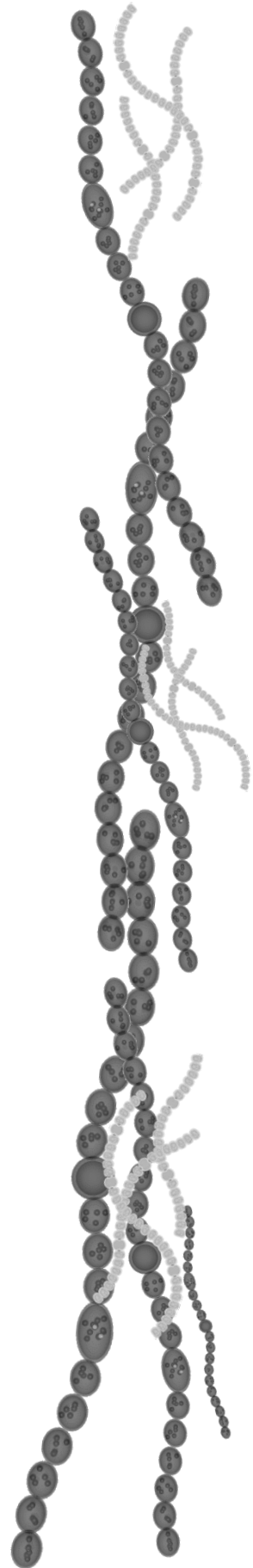
Tabela 8.13 - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).....88

Tabela 8.14 - Resultados do ensaio do branqueamento do β -caroteno dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).....89

Lista de abreviaturas

- AAC** – Coeficiente de Atividade Antioxidante (do inglês *Antioxidant Activity Coefficient*)
- Abs** – Absorvância
- ABTS** - ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (do inglês *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
- CIIMAR** - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
- CNS** – Controlo negativo do solvente
- CP** – Controlo positivo
- CV** – Coeficiente de variação
- DHA** - Ácido docosaexaenóico
- DMEM** – Meio Eagle Modificado da Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
- DP** – Desvio padrão
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
- EAG** – Equivalentes de Ácido Gálico
- EQR** – Equivalentes de Quercetina
- ESSACC** – Coleção de cultura de algas Estela Sousa e Silva (do inglês *Estela Sousa e Silva Algae Culture Collection*)
- ET** – Equivalentes de Trolox
- ETAR** - Estação de Tratamento de Águas Residuais
- Fe(III)** – Óxido de ferro
- FC** – Reagente de Folin-Ciocalteu
- HEK** - Rim embrionário humano (do inglês *Human Embryonic Kidney*)
- HPH** - Homogeneização a alta pressão (do inglês *High pressure homogenization*)
- HVED** - Descargas elétricas de alta tensão (do inglês *High voltage electrical discharges*)
- IP** – Percentagem de inibição (do inglês *inhibition percentage*)
- LEGE** – Código das estirpes de cianobactérias da Coleção de Cultura “Blue Biotechnology and Ecotoxicology”
- LMECYA** – Código das estirpes de cianobactérias da coleção ESSACC
- MAA** - Aminoácidos tipo micospolina (do inglês *Mycosporine like amino acids*)
- MTT** - 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio tetrazólio (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium*)
- PEF** - Campo elétrico pulsado (do inglês *Pulsed electric field*)
- PHA** - poli-hidroxiálanoatos (do inglês *polyhydroxyalkanoates*)
- PSP** - Venenos Paralíticos de Marisco (do inglês *Paralytic Shellfish Poisons*)
- PST** – Toxinas Paralíticas de Marisco (do inglês *Paralytic Shellfish Toxins*)
- PUFA** – Ácidos gordos polinsaturados (do inglês *Polyunsaturated fatty acid*)
- SCY** - Scytonemin
- SOR** – Radical oxigénio singlet (do inglês *Singlet oxygen radical*)
- ROS** – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive oxygen species*)
- WWT** - Estação de tratamento de águas residuais (do inglês *Wastewater Treatment Plant*)

1. Introdução



1.1. Cianobactérias: Origem e características

É ainda desconhecido o momento exato do surgimento das cianobactérias no planeta Terra (Vincent, 2009). Existem evidências fósseis que remontam ao Pré-Câmbrico, em diversos locais geograficamente diversos, principalmente na forma de estromatólitos e oncólitos, pelo que durante o último quarto de século se tem admitido que estas tenham evoluído há cerca de 3 a 3,5 biliões de anos atrás (Rastogi & Sinha, 2009; Patel, 2016). No entanto, devido a estes organismos apresentarem dimensões extremamente pequenas, é difícil interpretar os seus registos fósseis, mesmo que alguns apresentem uma extraordinária similaridade morfológica em relação aos seus homólogos atuais (Thajuddin & Subramanian, 2005). Atualmente, admite-se que esta data relativa à origem destes organismos esteja errada, devido à dificuldade de interpretar os dados disponíveis e ao facto de os investigadores terem “seleccionado” para estudo espécimes que se adequavam a essa assunção. Com base em relatórios mais recentes, os ficologistas admitem que “o momento real da evolução” das cianobactérias se situe mais próximo de 2,7 biliões de anos atrás (Lee, 2018). Pensa-se, também, que as cianobactérias, apesar da incerteza em relação ao momento exato do seu aparecimento, foram os primeiros organismos fototróficos oxigénicos e que tiveram um papel extremamente importante na criação da atmosfera aeróbica do nosso planeta e ainda hoje continuam a representar um dos mais bem-sucedidos organismos do planeta Terra (Vincent, 2009; Meriluoto *et al.*, 2017).

As cianobactérias, também denominadas algas azuis-esverdeadas ou cianófitas, são procariotas fotossintéticos, ou seja, utilizam a luz solar como fonte energética para converter carbono em biomassa (Rastogi & Sinha, 2009; Huisman *et al.*, 2018). Constituem, ainda hoje, os maiores agentes do ciclo biológico de carbono, azoto e minerais (Meriluoto *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017). Representam um dos grupos de procariotas mais diversificado em relação à sua morfologia, fisiologia e metabolismo (Figura 1.1)(Waterbury, 2006).

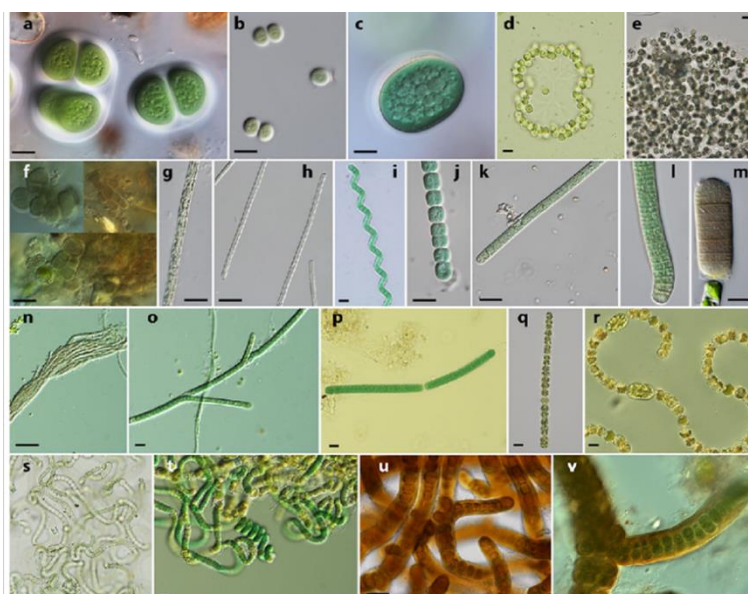


Figura 1.1. - Diversidade morfológica em cianobactérias. **a** - *Chroococcus subnudus*, **b** - *Ch. limneticus*, **c** - *Cyanothece aeruginosa*, **d** - *Snowella litoralis*, **e** - *Microcystis aeruginosa*, **f** - *Pleurocapsa minor*, **g** - *Planktothrix agardhii*, **h** - *Limnothrix redekei*, **i** - *Arthrospira jenneri*, **j** - *Johanseninema constrictum*, **k** - *Phormidium* sp., **l** e **m** - *Oscillatoria* sp., **n** - *Schizothrix* sp., **o** - *Tolypothrix* sp., **p** - *Katagnymene accurata*, **q** - *Dolichospermum planctonicum*, **r** - *Dolichospermum* sp., **s** - *Nostoc* sp., **t** - *Nodularia moravica*, **u** e **v** - *Stigonema* sp. Barra de escala: **a** – **u** = 10 µm, **v** = 20 µm (**Fonte:** Dvořák *et al.*, 2015).

Este grupo de organismos foi inicialmente classificado como algas azuis-esverdeadas, com base no Código Botânico Internacional (Mur *et al.*, 1999), devido a determinadas características em comum com

as mesmas, como a presença de clorofila *a* em vez de bacterioclorofila, a produção fotossintética de oxigênio e a semelhança morfológica com as algas (Vincent, 2009; Mur *et al.*, 2013). No entanto, relacionam-se melhor com bactérias procariotas do que com algas eucariotas (Lee, 2018), devido à ausência de núcleo e outros organelos celulares e à presença de ribossomos específicos de organismos procariotas e de uma parede celular de peptidoglicanos semelhante à das bactérias Gram-negativo. Vários estudos de sequenciação molecular já demonstraram esta semelhança com bactérias procariotas, pelo que, atualmente, as cianobactérias são classificadas como procariotas fotossintéticos (Vincent, 2009). No entanto, a estrutura subcelular das cianobactérias é mais sofisticada que a da maioria das bactérias (Waterbury, 2006; Vincent, 2009).

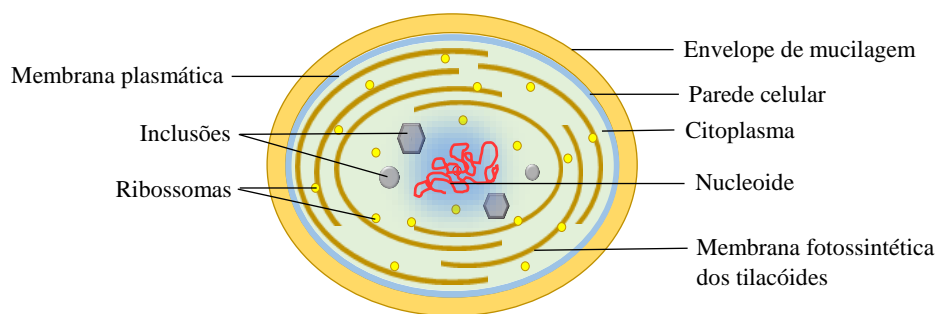


Figura 1.2. - Corte transversal de uma célula cianobacteriana.

As cianobactérias podem ocorrer na forma de células individuais ou em colônias, podendo estar enclausuradas numa massa gelatinosa (mucilagem) que varia em consistência e espessura, dependendo das condições ambientais e na qual se podem acumular diversos pigmentos conferindo diferentes colorações às células. As colônias em forma de filamentos são designadas de tricomas (Thajuddin & Subramanian, 2005; Castenholz, 2015). Algumas cianobactérias filamentosas apresentam, para além das células vegetativas, células com funções especializadas:

- Heterocistos, estruturalmente diferentes das células vegetativas, são células de paredes espessas onde se encontra a enzima nitrogenase utilizada na fixação de azoto atmosférico livre (Castenholz, 2015);
- Acinetos, que são células de resistência a condições ambientais adversas, também estruturalmente diferentes das células vegetativas (Castenholz, 2015);
- Cianobactérias das ordens Nostocales e Stigonematales, produzem também hormogónias, estruturas de reprodução que consistem em filamentos de 5 a 15 células móveis relativamente diferentes das células vegetativas, que representam a fase migratória (de dispersão) das mesmas. Esta diferenciação celular representa uma estratégia evolutiva de sobrevivência e adaptação a ecossistemas em mudança (Flores & Herrero, 2014; Vinogradova, 2016).

Apresentam, também, uma variedade de estruturas celulares e inclusões com funções especializadas que contribuem para o seu sucesso ecológico, como as membranas dos tilacóides, a região do nucleóide/centroplasma e corpos de armazenamento de nutrientes e metabolitos (Vincent, 2009).

As cianobactérias possuem diversos mecanismos de adaptação à luz, como por exemplo, a capacidade de alterarem a superfície fotossintética dos seus tilacóides como resposta à quantidade e qualidade da luz solar capturada e a capacidade de alterar a síntese das ficobiliproteínas conforme a necessidade dos diferentes pigmentos cromáticos (Walsh *et al.*, 1997). As ficobiliproteínas são pigmentos responsáveis pela coloração azul-esverdeada das suas células, maioritariamente a ficocianina, estão presentes nas membranas dos tilacóides e são excelentes guias e coletores da luz solar capturada para os centros de reação da fotossíntese. Determinadas cianobactérias possuem também ficoeritrina, que confere uma coloração avermelhada e/ou preta às células (Waterbury, 2006; Vincent, 2009).

Para além da fotossíntese oxigénica, as cianobactérias também podem realizar fotossíntese anoxigénica e algumas espécies têm atividade heterotrófica. Algumas também realizam mixotrofia, em que assimilam componentes orgânicos, como aminoácidos, para suplementar a fixação de carbono autotrófica. Porém, existem evidências de que todas as cianobactérias têm a capacidade de alterar o seu modo de metabolismo (Abed *et al.*, 2009).

Em relação ao seu crescimento e reprodução, ocorre maioritariamente por divisão celular através de fissão binária, sendo que algumas espécies apresentam um ciclo de vida morfogenético mais complexo envolvendo fases hormogoniais sem crescimento celular e o crescimento diferencial de determinadas porções dos filamentos (Castenholz, 2015).

1.2. Ecologia e habitat das cianobactérias

O número de espécies de cianobactérias atualmente conhecido ronda os 3000 – 4000, estando estas distribuídas em 150 géneros e em 5 ordens, apresentando uma grande variedade de tamanhos e formas (Dvořák *et al.*, 2017). Estes organismos podem ser encontrados em todos os tipos de habitat, desde rochas, solo, água e ar, pois são maioritariamente cosmopolitas, e toleram uma ampla diversidade de condições ambientais (Singh *et al.*, 2011; Castenholz, 2015). O seu habitat mais comum é o aquático onde podemos encontrar 3 grandes grupos ecológicos:

- As espécies bentónicas, que formam tapetes celulares, também designados como biofilmes, com uma espessura entre 1 e 2 milímetros a dezenas de centímetros, sobre rochas, sedimentos e plantas submergidas. São encontradas abundantemente em zonas húmidas, como pântanos e também em lagos e riachos no Ártico e Antártida, lagos hipersalinos e fontes geotermas. Em locais com pouca profundidade, têm um papel significativo na manutenção da fertilidade do solo, na colonização inicial, no estabelecimento de flora e na acumulação de húmus. Os géneros mais comuns deste grupo são os *Chroococcus*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Schizothrix* e *Scytonema*. A sua capacidade de formar tapetes celulares provém da excreção de substâncias poliméricas extracelulares que unem as células individuais ou as colónias, conferindo-lhes uma estrutura coesa (Thajuddin & Subramanian, 2005; Meriluoto *et al.*, 2017; Lee, 2018);
- As espécies planctónicas, que se encontram à deriva na coluna de água, crescem em abundância e podem formar florescências (crescimento massivo). Neste grupo, encontram-se um grande número de estirpes produtoras de toxinas responsáveis por um amplo espectro de problemas de qualidade da água, que podem provocar um odor desagradável, turvação da água, asfixia da vegetação aquática submergida e anoxia nas massas de água. Estas condições interferem com o uso da água para consumo e de atividades recreativas. São encontradas maioritariamente em águas doces, paradas e ricas em nutrientes. Os géneros mais comuns deste grupo são *Anabaena* (*Dolichospermum*), *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Planktothrix* (Whitton, 2000);
- As espécies de picocianobactérias, que apresentam as células com as dimensões mais reduzidas (inferior a 2 µm), e ocorrem, normalmente, em grandes concentrações, representando, possivelmente, o tipo de células fotossintéticas mais abundante na biosfera. São amplamente encontradas em ambientes de água salgada e doce. Os géneros mais comuns deste grupo são: *Synechococcus*, *Synechocystis* e *Prochlorococcus* (Meriluoto *et al.*, 2017).

Em muitos dos ambientes em que se encontram, as cianobactérias são os produtores primários na base da cadeia alimentar. Embora sejam capazes de existência livre, algumas formam relações simbióticas com grandes grupos de animais e plantas (Thajuddin & Subramanian, 2005). Têm também um papel muito importante na dinâmica do azoto (pois têm a capacidade de fixar o azoto atmosférico livre), carbono e oxigénio, principalmente em ambientes aquáticos (Vincent, 2009).

Não existe um padrão consistente de tolerância e requisitos relativamente a fatores ecológicos para as cianobactérias e, assim, a sua distribuição geográfica varia inter e intraespécies.

1.3 Compostos bioativos de cianobactérias

Como resultado da adaptação a diversos habitats, as cianobactérias desenvolveram um grande número de mecanismos contra o *stress* ambiental, produzindo uma enorme diversidade de metabolitos secundários (Babić *et al.*, 2016; Patel, 2016). Alguns desses metabolitos secundários são químicos protetores eficientes contra o *stress* oxidativo e radicais livres e não-livres. A estrutura destes compostos varia de moléculas simples a moléculas mais complexas, constituídas por várias unidades de monómeros (Dang *et al.*, 2018). A tabela 1.1 apresenta alguns exemplos de compostos bioativos secundários produzidos por cianobactérias.

Tabela 1.1. – Exemplos de compostos secundários bioativos produzidos por cianobactérias. (Fonte: Wada & Murata, 1998; Singh *et al.*, 2017b).

Grupo de compostos	Constituintes dos grupos de compostos		
Terpenóides	Esteróis	Saturados	4 α -methylsterols, 5 α -cholestan-3 β -ol
		Insaturados	Colesterol
			Sitosterol
			Carotenóides
	Astaxantina		
	Luteína		
	Zeaxantina		
	Fitohormonas	Auxinas	
		Giberelinas	
		Citocinas	
		Etileno	
Fitóis			
Compostos fenólicos	Polifenóis	Ácido gálico	
		Tocoferol	
		Ácido gálico	
		Ácido cinâmico	
		Flavonóides:	Catequina
			Epicatequina
			Quercetina
Lípidos	Ácidos gordos saturados	Ácido mirístico	
		Palmítico	
		Esteárico	
	Ácidos gordos monoinsaturados	Ácidos palmitoleico	
		Ácido oleico	
		Elaídico	
	Ácidos gordos polinsaturados	Ácidos linoleico	
		Ácido araquidónico	
		Ácido eicosapentaenóico	
Pigmentos	Ficobiliproteínas	Ficocianina	
		Ficoeritrina	
		Aloficianina	
Foto-protetores	Aminoácidos tipo micosporina		
	Scytonemina		
Polissacáridos	Ficocolóides		

	Carragenina
	Agar
	Alginato
	Lectina

1.3.1 Compostos fenólicos

Um exemplo são os compostos fenólicos, que são caracterizados como “compostos de *stress*”, pois participam em mecanismos de defesa contra *stress* bióticos, como por exemplo bactérias, e abióticos, como a radiação UV. Estruturalmente, estes compostos têm pelo menos um anel fenólico e mostram fortes atividades biológicas quando halogenados. De entre destes compostos salientam-se os polifenóis (Singh *et al.*, 2017b). Estes são constituídos, entre outros, pelos flavonóides, que são a maior classe de polifenóis, com uma cadeia de estrutura difenilpropano comum. Têm um grande espectro de atividades biológicas e atuam como quelantes. Refira-se, também, outros compostos como o ácido gálico, a catequina, a epicatequina e a quercetina (Rice-Evans *et al.*, 1997).

1.3.2 Terpenóides

Os terpenóides são outro exemplo de metabolitos secundários das cianobactérias e são compostos orgânicos com um papel importante no crescimento e desenvolvimento das mesmas e nos processos de atração dos polinizadores (Pattanaik & Lindberg, 2015). Neste grupo estão incluídos:

- Carotenóides - são pigmentos naturais (lipofílicos) acessórios da fotossíntese com uma estrutura polimérica e propriedades foto-protetoras sob *stress* radioativo e uma função central na captação de luz. A sua síntese pode ser afetada por diversos estímulos ambientais (Vílchez *et al.*, 2011). Possuem uma coloração vermelha-alaranjada (Paliwal *et al.*, 2016). Dividem-se em duas classes (Hirschberg & Chamovitz, 1994):
 - Carotenos – são hidrocarbonetos que não contêm oxigénio. O composto mais comum desta classe é o β -caroteno;
 - Xantófilas – são derivados dos carotenos que contêm oxigénio. Os compostos mais comuns desta classe são a astaxantina e a fucoxantina;
- Fitóis – são componentes cruciais da clorofila e cofatores da fotossíntese (Singh *et al.*, 2017b);
- Esteróis – são componentes essenciais das membranas celulares cujas funções abrangem o controlo da fluidez e permeabilidade das mesmas (Volkman, 2003);
- Hormonas - as cianobactérias também produzem e acumulam um diverso grupo de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocinas e etileno (Hussain & Hasnain, 2011).

1.3.3 Lípidos

As cianobactérias apresentam uma composição lipídica interessante devido ao abrangente grupo de compostos que produzem, incluindo ácidos gordos, gorduras, ceras, vitamínicos lipossolúveis, mono e diglicerídeos, fosfolípidos, entre outros. Existem 3 classes de ácidos gordos em algas marinhas e cianobactérias que têm um papel chave no metabolismo celular das mesmas e que são dos principais constituintes dos lípidos (Singh *et al.*, 2002):

- Ácidos gordos saturados como os ácidos mirístico, palmítico e esteárico;
- Ácidos gordos monoinsaturados como os ácidos palmitoleico, oleico e elaídico;
- Ácidos gordos polinsaturados como os ácidos linoleico, araquidónico e eicosapentaenóico (Wada & Murata, 1998).

1.3.4 Pigmentos

As cianobactérias produzem, também, uma grande diversidade de pigmentos com funções desde a absorção de luz à proteção de danos causados pela mesma (Dufossé *et al.*, 2005). O principal pigmento é a clorofila *a*, que é um pigmento fotossintético primário. Existem também as ficobiliproteínas, que se encontram nos ficobilissomas (Figura 1.3) e que são constituídas a partir de bilinas e apoproteínas. São extremamente coloridas, fluorescentes e solúveis em água e podem ser divididas em 3 grupos de acordo com a sua absorvância máxima (Pandey *et al.*, 2013):

- Aloficocianina – 650 nm;
- Ficocianina – 620 nm;
- Ficoeritrina – 565 nm.

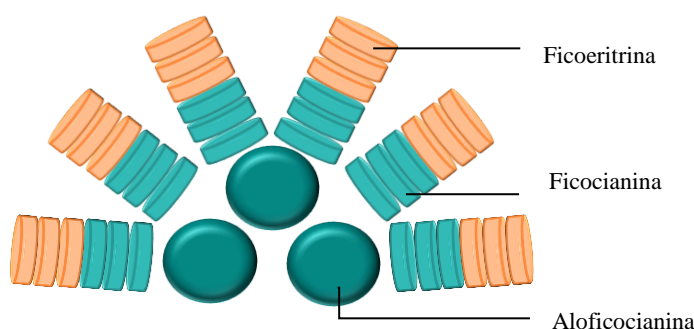


Figura 1.3. - Estrutura de um ficobilissoma.

1.3.5 Cianotoxinas

Estes metabolitos secundários são divididos em vários grupos funcionais com base nos seus efeitos tóxicos nos organismos (Tabela 1.2). Determinados tipos de toxinas produzidas por cianobactérias são solúveis em água, levando à sua acumulação em organismos aquáticos, especialmente peixes, moluscos e bivalves (Huisman *et al.*, 2018). Esta bioacumulação pode afetar severamente a saúde humana, de animais selvagens e domésticos. Afetam fortemente a qualidade da água e representam uma grande preocupação em Saúde Pública. Os diferentes tipos de toxinas e as diferentes espécies das cianobactérias que as produzem estão descritos na tabela 1.1 (Rastogi & Sinha, 2009; Singh *et al.*, 2017b).

Tabela 1.2. - Classes de toxinas e gêneros de cianobactérias produtoras (Carmichael, 2001; Svirčev *et al.*, 2019).

Classes de toxinas	Toxina	Cianobactéria produtora (gênero)
Neurotoxinas (afetam o sistema nervoso)	Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> (<i>Planktothrix</i>)
	Homo-anatoxina-a	
	Anatoxina-a (s)	<i>Anabena</i> , <i>Oscillatoria</i> (<i>Planktothrix</i>)
	Saxitoxinas (Paralytic Shellfish Toxins- PST ou Paralytic Shellfish Poisons - PSP)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i>
Hepatotoxinas (afetam o fígado)	Cilindrospermopsina	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i>
	Microcistinas	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> (<i>Planktothrix</i>)
	Nodularina	<i>Nodularia</i>
Dermatotoxinas (afetam a pele)	Debromoaplisiatoxina	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i>
	Lingbiatoxina	
	Aplisiatoxina	
Toxinas Irritantes (afetam todos os tecidos expostos)	Lipopolissacáridos	Todas

1.3.6 Outros

Os polissacáridos, constituídos por monossacáridos ligados entre si, são uma fonte de carbono e energia e são excretados durante os processos fisiológicos normais das cianobactérias e sob *stress* ambiental (Bertocchi *et al.*, 1990).

As cianobactérias produzem diversas proteínas e aminoácidos necessários ao ser humano e o conteúdo destes compostos é equiparável ao da soja e do ovo e são também produtores de quase todas as vitaminas e micro e macrominerais fundamentais para a dieta humana (Christaki *et al.*, 2011).

Outros compostos que produzem são os foto-protetores, cujas propriedades são ativadas sob *stress* radioativo. Alguns exemplos dos mesmos são os aminoácidos tipo micosporina (MAA – *mycosporine like amino acids*), compostos intracelulares incolores e hidrofílicos, e a *scytonemina* (SCY), pigmento lipossolúvel reportado em cianobactérias como tendo uma cor amarela-acastanhada (Singh *et al.*, 2017b).

Algumas cianobactérias, em condições de *stress* férrico, produzem sideróforos, ligandos de baixo peso molecular com alta afinidade para o óxido de ferro (Fe(III)) (Rastogi & Sinha, 2009) e produzem poli-hidroxialanoatos (PHA – *polyhydroxyalkanoates*) (Figura 1.4), um material lipídico acumulado na presença de fontes abundantes de carbono. O carbono é bioquimicamente processado e armazenado na forma de inclusões insolúveis em água (grânulos) no citoplasma das células (Abed *et al.*, 2009).

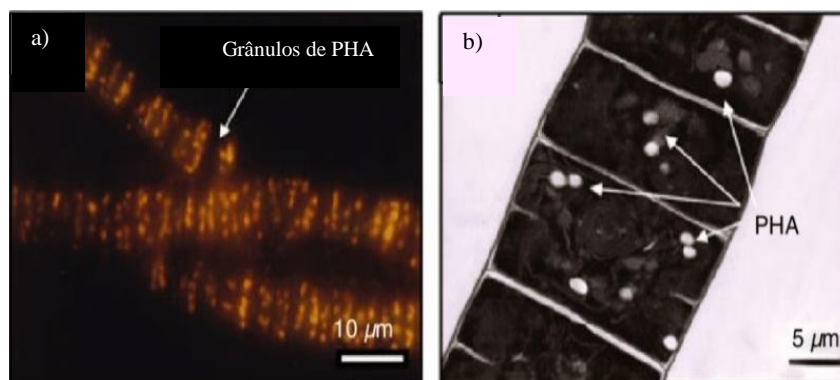


Figura 1.4. – a) Grânulos de PHA, acumulados por *Spirulina platensis*, corados com azul de Nilo A. Os grânulos de PHA aparecem como partículas laranja brilhantes no citoplasma da célula quando vistos sob microscópio de fluorescência. b) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando os grânulos de PHA acumulados no citoplasma de *S. platensis*. (Adaptado de Abed *et al.*, 2009).

1.4 Atividade e perfil antioxidante de cianobactérias

A oxidação pode ser definida como a conversão de uma substância química noutra com menos elétrons (Clark, 2013). O *stress* oxidativo produz radicais livres, aumentando a sua concentração intracelular e originando a destruição oxidativa das células, por necrose e/ou apoptose. Esta destruição causa o aparecimento de várias doenças e o envelhecimento precoce (Patel *et al.*, 2006). Estes radicais livres são também designados como espécies reativas de oxigénio (ROS) e abrangem radicais como o anião superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrogénio, entre outros (Huang *et al.*, 2005). Os ROS causam a oxidação lipídica, deteriorando os alimentos e afetando as suas propriedades organoléticas. De facto, as reações de oxidação envolvendo lipídios, proteínas e hidratos de carbono, causam a alteração da cor, odor, sabor, textura e valor nutritivo dos alimentos e até a formação de produtos secundários que podem ser potencialmente tóxicos (De Alencar *et al.*, 2018).

De uma forma geral, nos sistemas biológicos, os antioxidantes podem ser definidos como (Patel, 2016):

- Primários, quando atrasam ou inibem o passo inicial da reação oxidativa e interrompem a etapa de propagação da mesma;
- Secundários, quando previnem a reação oxidativa.

Tanto para os antioxidantes primários como para os secundários, existem 2 tipos de mecanismos de defesa antioxidante (Ismaiel *et al.*, 2014):

- Os enzimáticos, através da ação de enzimas como a peroxidase, catalase e superoxidase dismutase;
- Os não-enzimáticos, através do sequestro de radicais, onde se incluem os carotenóides, as vitaminas, os flavonóides, entre outros.

No entanto, a definição de antioxidante é controversa e difere de acordo com a sua aplicação. No ramo alimentar é normalmente restrita a agentes com a capacidade de quebrar o início e/ou a proliferação de reações de oxidação lipídica (Latifi *et al.*, 2009). Compostos com atividades antioxidantes têm sido utilizados em produtos alimentares de forma a combater os efeitos da oxidação lipídica e a prolongar, assim, o prazo de validade dos alimentos (e a sua *shelf life*) (Ismaiel *et al.*, 2014).

Porém, atualmente, a maioria dos antioxidantes disponíveis no mercado são sinteticamente produzidos e podem conter elevados níveis de conservantes, sendo assim suspeitos de serem tóxicos e promotores de carcinogénese (de Abreu *et al.*, 2010; Patel, 2016; Andrade *et al.*, 2019). Portanto, de forma a substituir os antioxidantes sintéticos, é necessário selecionar fontes naturais para a sua produção (Safar *et al.*, 2015).

Existem já alguns produtos, como suplementos alimentares, que contêm antioxidantes de origem natural, como:

- Antioxidantes, extraídos de *Spirulina sp.* e outras microalgas, *Ginkgo Biloba*, cúrcuma, uva, entre outros (<https://www.celeiro.pt/> Acedido a 16 de Julho de 2018);
- Antioxidante extraídos de *Chlorella sp.* e plantas marinhas, incluindo astaxantina extraída da alga *Haematococcus pluvialis* (<https://greennutritionals.com.au> Acedido a 16 de Julho de 2018);
- Bebida antioxidante produzida a partir de *Spirulina platensis* (<https://www.b-blue.com/> Acedido a 16 de Julho de 2018).

As cianobactérias exibem um largo espectro de compostos antioxidantes quando comparadas com a maioria das plantas terrestres, sendo assim consideradas valiosas fontes naturais de antioxidantes (Safafar *et al.*, 2015).

Existem vários trabalhos publicados sobre a avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de microalgas eucariotas pertencentes a géneros como *Botryococcus* (Rao *et al.*, 2006), *Navicula* (Hemalatha *et al.*, 2013), *Chlorella* (Wu *et al.*, 2005), *Dunaliella* (Herrero *et al.*, 2006), *Phaeodactylum* (Guzman *et al.*, 2001), *Nannochloropsis*, *Chaetoceros* (Goh *et al.*, 2010), *Halochlorococcum* e *Oltamannsiellopsis* (Lee *et al.*, 2010) e cianobactérias pertencentes a géneros como *Nostoc* (Choochote *et al.*, 2014; Bavini, 2018) e *Spirulina* (Safafar *et al.*, 2015). A tabela 1.3 apresenta exemplos de alguns trabalhos de investigação realizados em cianobactérias em relação à sua atividade antioxidante e conteúdo em determinados compostos que contribuem para esta atividade. Os compostos produzidos por cianobactérias mais estudados em relação à sua atividade antioxidante são, na sua maioria, os descritos abaixo.

1.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são conhecidos como importantes antioxidantes naturais por doarem elétrons simples a cada átomo radical livre (Figura 1.5) ou a um substrato de enzimas antioxidantes para a detoxificação do H_2O_2 que é produzido sob condições extremas.

Os compostos fenólicos têm também um papel como quelantes de metais e oxigénio *singlet* (ROS) (Figura 1.6) (Safafar *et al.*, 2015).

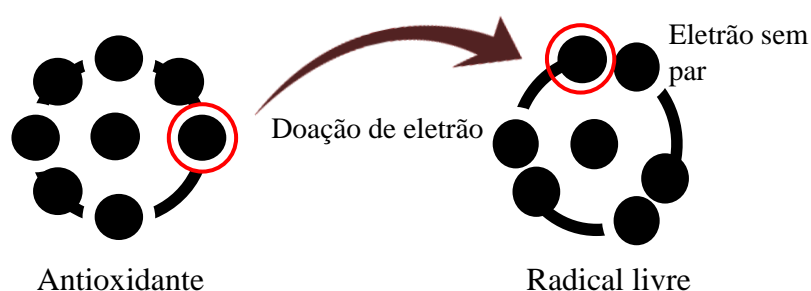


Figura 1.5. - Representação da ação antioxidante dos lípidos por doação de elétrons simples.



Figura 1.6. - Representação da função quelante dos antioxidantes lipídicos.

Tabela 1.3 – Resultados previamente publicados sobre a atividade antioxidante e compostos com atividade antioxidante de cianobactérias (IP – percentagem de inibição; IC₅₀ - concentração que induz metade da atividade inibitória máxima; EAG – equivalentes de ácido gálico; EQR – equivalentes de quercetina).

Estirpe	Solvente	Ensaio			Referência
		DPPH	Fenólicos	Flavonóides	
<i>Nostoc</i>	Metanol	28 % IP	-	-	(Zeeshan <i>et al.</i> , 2010)
<i>Tolypothrix sp.</i>	Metanol	18 % IP			
<i>Phormidium sp.</i>	Metanol	22 % IP			
<i>Cylindrospermum sp.</i>	Metanol	7% IP			
<i>Anabaena doliolum</i>	Metanol	2.64 ± 0.19 IC ₅₀	47.77 ± 3.4 mg EAG/g peso fresco	106.93 ± 4.25 µg EQR/g peso fresco	(Singh <i>et al.</i> , 2017a)
<i>Calothrix geitonos</i>	Metanol	1.06 ± 0.18 IC ₅₀	22.80 ± 2.3 mg EAG/g peso fresco	91.0 ± 1.8 µg EQR/g peso fresco	
<i>Limnithrix obliqueacuminata</i>	Metanol	2.95 ± 0.20 IC ₅₀	44.80 ± 3.9 mg EAG/g peso fresco	106.9 ± 7.3 µg EQR/g peso fresco	
<i>Oscillatoria acuta</i>	Metanol	2.63 ± 0.36 IC ₅₀	290.23 ± 2.2 mg EAG/g peso fresco	634.0 ± 5.1 µg EQR/g peso fresco	
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Metanol	8.91 ± 0.73 IC ₅₀	39.03 ± 1.8 mg EAG/g peso fresco	115.03 ± 5.2 µg EQR/g peso fresco	
<i>Anabaena constricta</i>	Metanol	0.91 ± 0.04 IC ₅₀	59.37 ± 4.0 mg EAG/g peso fresco	201.97 ± 3.3 µg EQR/g peso fresco	
<i>Synechocystis sp.</i>	Metanol	1.52 ± 0.06 IC ₅₀	54.93 ± 2.65 mg EAG/g peso fresco	275.47 ± 2.8 µg EQR/g peso fresco	
<i>Scytonema simplex</i>	Metanol	1.42 ± 0.19 IC ₅₀	32.77 ± 2.65 mg EAG/g peso fresco	71.1 ± 2.8 µg EQR/g peso fresco	
<i>Calothrix brevissima</i>	Metanol	2.24 ± 0.18 IC ₅₀	31.47 ± 2.01 mg EAG/g peso fresco	95.13 ± 2.7 µg EQR/g peso fresco	
<i>Cylindrospermum sp.</i>	Metanol	1.27 ± 0.06 IC ₅₀	34.07 ± 4.27 mg EAG/g peso fresco	157.9 ± 2.8 µg EQR/g peso fresco	
<i>Limnithrix sp.</i>	Metanol	1.82 ± 0.09 IC ₅₀	24.93 ± 2.4 mg EAG/g peso fresco	130.77 ± 1.7 µg EQR/g peso fresco	
<i>Lyngbya sp.</i>	Metanol	2.61 ± 0.13 IC ₅₀	92.03 ± 1.59 mg EAG/g peso fresco	192.37 ± 2.0 µg EQR/g peso fresco	
<i>Phormidium tenue</i>	Metanol	2.69 ± 0.21 IC ₅₀	30.63 ± 1.04 mg EAG/g peso fresco	95.20 ± 2.05 µg EQR/g peso fresco	
<i>Anabaena flos-aquae</i> FACHB 245	Hexano	-	5.48 ± 0.08 mg EAG/g	-	(Li <i>et al.</i> , 2007)
	Acetato de etilo		2.99 ± 0.03 mg EAG/g		
	Água		2.52 ± 0.01 mg EAG/g		
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/11	Hexano		5.14 ± 0.82 mg EAG/g		
	Acetato de etilo		3.12 ± 0.01 mg EAG/g		
	Água		2.65 ± 0.04 mg EAG/g		
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/16	Hexano		3.43 ± 0.35 mg EAG/g		
	Acetato de etilo		1.57 ± 0.04 mg EAG/g		
	Água		2.20 ± 0.03 mg EAG/g		
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/17	Hexano		39.87 ± 1.92 mg EAG/g		
	Acetato de etilo		9.80 ± 0.05 mg EAG/g		
	Água		10.68 ± 0.30 mg EAG/g		
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/19	Hexano		2.68 ± 0.08 mg EAG/g		
	Acetato de etilo		2.70 ± 0.08 mg EAG/g		
	Água		4.38 ± 0.03 mg EAG/g		

Estirpe	Solvente	Ensaio			Referência
		DPPH	Fenólicos	Flavonóides	
<i>Nostoc commune</i>	Metanol	-	-		(Rodríguez-Martel <i>et al.</i> , 2017)
	Água	-			
<i>Nostoc sp.</i>	Metanol	27.89 ± 0.01 % IP			
	Água	-			
<i>Leptolyngbya protospir</i>	Metanol	7.65 ± 0.01 % IP			
	Água	-			
<i>Nodularia spumigen</i>	Metanol	13.02 ± 0.02 % IP			
	Água	-			
<i>Phormidiochaete sp.</i>	Metanol	14.59 ± 0.01 % IP			
	Água	9.14 ± 0.02 % IP			
<i>Arthrospira platensis (AA)</i>	Metanol	-			
	Água	-			
<i>Arthrospira platensis</i>	Metanol	-			
	Água	-			
<i>Nostoc M1</i>	Etanol	102.47±7.29 IC ₅₀ µg/mL			(Babić <i>et al.</i> , 2016)
<i>Anabaena M2</i>		50.54±4.74 IC ₅₀ µg/mL			
<i>Calothrix M2</i>		30.72±3.31 IC ₅₀ µg/mL			
<i>Oscillatoria M2</i>		93.25±8.63 IC ₅₀ µg/mL			
<i>Phormidium M1</i>		47.62±7.59 IC ₅₀ µg/mL			
<i>Oscillatoria agardhii</i>	Metanol	Máximo de 92 %IP	20.91±0.21 mg EAG/g peso seco	12.11±0.04 mg EQR/g peso seco	(El-Aty <i>et al.</i> , 2014)
	Acetona	Máximo de 81 %IP	16.23±0.03 mg EAG/g peso seco	11.09±0.02 mg EQR/g peso seco	
	Água	Máximo de 50 %IP	8.04±0.02 mg EAG/g peso seco	5.06±0.07 mg EQR/g peso seco	
<i>Anabaena sphaerica</i>	Metanol	Máximo de 62 %IP	14.81±0.02 mg EAG/g peso seco	3.54±0.01 mg EQR/g peso seco	
	Acetona	Máximo de 63 %IP	5.27±0.11 mg EAG/g peso seco	4.52±0.09 mg EQR/g peso seco	
	Água	Máximo de 49 %IP	4.34±0.07 mg EAG/g peso seco	3.21±0.03 mg EQR/g peso seco	
<i>Oscillatoria sp.</i>	Água	465.31 ± 25.76 mg ácido ascórbico/g	2.96 ± 0.14 mg EAG/g peso seco	552.59 ± 46.27 mg EQR/g peso seco	(Hossain <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lyngbya sp.</i>		248.39 ± 11.97 mg ácido ascórbico/g	5.02 ± 0.20 mg EAG/g peso seco	664.07 ± 19.76 mg EQR/g peso seco	
<i>Microcystis sp</i>		465.31 ± 25.76 mg ácido ascórbico/g	2.65 ± 0.14 mg EAG/g peso seco	392.00 ± 41.71 mg EQR/g peso seco	
<i>Spirulina sp</i>		213.48 ± 18.19 mg ácido ascórbico/g	1.78 ± 0.07 mg EAG/g peso seco	483.33 ± 13.92 mg EQR/g peso seco	
<i>N. spongiaeforme</i>	Metanol	Máximo de 99 %IP	-	-	(Geethu & Shamina, 2018)

Estirpe	Solvente	Ensaio			Referência
		DPPH	Fenólicos	Flavonóides	
<i>Oscillatoria limosa</i>	Metanol	97±0.327 µg de equivalentes de ácido ascórbico	33.4±0.45 µg de EAG	-	(Rajishamol <i>et al.</i> , 2016)
<i>Synechococcus elongatus</i>		92.62±0.419 µg de equivalentes de ácido ascórbico	21.33±1.528 µg de EAG		
<i>Synechocystis aquatilis</i>		83.836±0.729 µg de equivalentes de ácido ascórbico	15.94 ±0.557 µg de EAG		
<i>Phormidium sp. LEGE05292</i>	Etanol	-	1.52 ± 0.03 mg EAG /g peso seco	-	(Bavini, 2018)
<i>Synechocystis salina LEGE06099</i>	Etanol	863.82 ±0.17 IC ₅₀ (µg/mL)	2.45 ± 0.13 mg EAG /g peso seco		
<i>Nodosilinea nodulosa LEGE06102</i>	Etanol	1077.59 ±0.03 IC ₅₀ (µg/mL)	1.23 ± 0,00 mg EAG /g peso seco		
<i>Cyanobium sp. LEGE06113</i>	Etanol	-	1.41 ± 0.05 mg EAG /g peso seco		
<i>Synechocystis salina LEGE06155</i>	Etanol	-	1.18 ± 0.05 mg EAG /g peso seco		
<i>Oscillatoriales LEGE07167</i>	Etanol	-	0.92 ± 0.02 mg EAG /g peso seco		
<i>Cyanobium sp. LEGE07175</i>	Etanol	-	1.09 ± 0.14 mg EAG /g peso seco		
<i>Tychonema sp. LEGE07196</i>	Etanol	-	1.07 ± 0.04 mg EAG /g peso seco		
<i>Phormidium fragile</i>	Etanol	Máximo de 22.95±0.65 % IP	1,5%	1,4%	(Sharathchandra & Rajashekhar, 2013)
	Metanol	Máximo de 25.33±0.45 % IP	1,8 %	1,26%	
<i>Lyngbya limnetica</i>	Etanol	Máximo de 32.15±0.85 % IP	3,5%	2,38%	
	Metanol	Máximo de 34.45±0.55 % IP	3%	2,25%	
<i>Scytonema bohnerei</i>	Etanol	Máximo de 26.35±0.90 % IP	1,2%	0,25%	
	Metanol	Máximo de 30.78±0.80 % IP	0,9%	0,7%	
<i>Calothrix fusca</i>	Etanol	Máximo de 19.35±1.0 % IP	2,6%	0,6%	
	Metanol	Máximo de 21.25±0.9 % IP	2,4%	0,8%	

Os polifenóis, tal como os flavonóides, atuam como poderosos antioxidantes devido à sua capacidade de fornecer hidrogénio dos seus grupos hidroxilo e de doar eletrões para impedir a produção de radicais livres que resultam do *stress* oxidativo (Goiris *et al.*, 2012).

Estes compostos têm mostrado uma atividade antioxidante mais eficaz que a das vitaminas E e C, em estudos *in vitro* (Rice-Evans & Miller, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1997).

1.4.2 Componentes lipófilos

Os constituintes lipófilos podem ser extremamente úteis na indústria alimentar na proteção contra a peroxidação dos lípidos devido à sua baixa polaridade e fácil dissolução. Alguns autores afirmam que a atividade antioxidante destes compostos está diretamente relacionada com o tamanho da cadeia hidrocarbonada na estrutura molecular dos mesmos (De Alencar *et al.*, 2018). Outros autores declaram que a atividade antioxidante está associada à composição dos ácidos gordos, em que um maior conteúdo em ácidos gordos insaturados representa uma maior atividade antioxidante (Banskota *et al.*, 2019).

1.4.3 Pigmentos

Os carotenóides são potentes antioxidantes biológicos pois são capazes de absorver a energia de excitação de radicais livres e de ROS na sua complexa cadeia de anéis (Naguib, 2000). Assim, ao captar e desativar os radicais livres, diminuem a deterioração celular, reduzindo os danos em moléculas como DNA, proteínas e lípidos de membrana (Guedes *et al.*, 2013a).

Os pigmentos β -caroteno e fucoxantina são os carotenóides mais estudados em relação à sua atividade antioxidante (Dang *et al.*, 2018).

As ficobiliproteínas também apresentam atividade antioxidante, que é realizada por:

- Via primária, através da ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina, que corresponde à destruição de espécies ROS através de reações *redox*;
- Via secundária, apenas através da aloficocianina e ficocianina, que corresponde à quelação de iões metálicos produzidos pelos ROS (Benedetti *et al.*, 2004; Sonani, 2015).

1.4.4 Compostos foto-protetores

A *scytonemin* apresenta uma absorção máxima em luz UV muito forte. A sua acumulação na bainha celular das cianobactérias protege as células contra os danos da luz UV. Este composto tem a capacidade de sequestrar as ROS (Pathak *et al.*, 2019).

OS MAA são capazes de disseminar efetivamente a radiação absorvida na forma de calor sem a produção de espécies reativas de oxigénio, sendo que a sua atividade antioxidante é secundária, pois previne reações oxidativas. Tem sido relatado que os MAA fornecem esta proteção não só aos seus produtores como aos seus consumidores primários e secundários (Singh *et al.*, 2017b).

1.5 Citoproteção e Citotoxicidade de cianobactérias

Os ROS são altamente destrutivos tanto para as estruturas como para as funções celulares e muitas das reações que ocorrem no metabolismo celular do oxigénio originam, inevitavelmente, a sua produção, como por exemplo, o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxil. Estes estão associados a vários processos patológicos como a carcinogénese, inflamação e envelhecimento precoce (Ishikawa *et al.*, 1998; Zeeshan & Prasad, 2009). A decomposição de H_2O_2 é fundamental para a proteção da célula contra os danos oxidativos, pois é este composto químico que origina $\bullet OH$, o ROS mais reativo (Ishikawa *et al.*, 1998).

As cianobactérias, como referido, realizam a fotossíntese oxigénica e a respiração aeróbica, funções que levam à produção secundária de $\bullet O_2^-$ e de H_2O_2 . Assim, a eliminação destes compostos pelas

cianobactérias é indispensável para a sua sobrevivência em condições aeróbicas (Obinger *et al.*, 1998). Com base na ideia de que o H_2O_2 atua como um dador de elétrons durante a fotossíntese, espera-se que os organismos fotossintéticos, como as cianobactérias, sejam resistentes a este composto (Samuilov *et al.*, 2001). Estas desenvolveram radicais inibidores e antioxidantes que fornecem proteção ao eliminarem os ROS (Zeeshan & Prasad, 2009). Estes podem ser eliminados por vários metabolitos (ascorbato, carotenóides, glutatona, vitaminas, etc.) e enzimas (superóxido dismutase, catalase e peroxirredoxinas), que convertem sequencialmente o $\bullet O_2^-$ em H_2O_2 e, subsequentemente, H_2O_2 em água (Cassier-Chauvat & Chauvat, 2015). Compostos bioativos produzidos pelas cianobactérias, como os carotenóides, compostos fenólicos e vitaminas, são também capazes de induzir a citoproteção e/ou citotoxicidade em células eucarióticas (Liu *et al.*, 2014).

Por outro lado, vários compostos isolados de cianobactérias marinhas demonstraram forte citotoxicidade contra células tumorais humanas. Estes podem causar alterações apenas em atividades intracelulares ou organelos, não afetando a membrana (Costa *et al.*, 2014). Os modelos de células com danos oxidativos induzidos por H_2O_2 têm sido intensamente estudados para explorar a atividade citoprotetora dos antioxidantes, nomeadamente na prevenção de alterações induzidas por *stress* oxidativo através da eliminação de ROS (Bruggisser *et al.*, 2002; Wijeratne *et al.*, 2005; Ju *et al.*, 2012; Bian *et al.*, 2015; Illam *et al.*, 2017; Ben Saad *et al.*, 2018).

1.6 Potencial biotecnológico

Alguns estudos têm identificado vários organismos marinhos como potencial fonte de componentes bioativos com aplicações biotecnológicas e, num período de cerca de 30 anos, a indústria biotecnológica das cianobactérias tem crescido e expandido para as cianobactérias de água doce como por exemplo os géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Microcystis* (Pulz & Gross, 2004; Kumar *et al.*, 2019).

1.6.1 Indústria alimentar

Com o contínuo aumento da população no planeta Terra, a necessidade de recursos aumenta e, consequentemente, aumenta a nossa dependência de culturas agrícolas. Para satisfazer a futura procura alimentar, as cianobactérias têm-se apresentado como um dos candidatos mais promissores (Guihéneuf *et al.*, 2016).

Os compostos biológicos presentes nas cianobactérias, constituem fontes nutritivas alternativas aos alimentos convencionais, podendo ter benefícios para a saúde humana e animal (Spolaore *et al.*, 2006; Christaki *et al.*, 2011; de Jesus Raposo *et al.*, 2013). As cianobactérias produzem também diversas enzimas, como o beta-lactase e o protease, que podem ser comercialmente explorados, com a vantagem de que os custos de produção da biomassa de cianobactérias são inferiores aos de bactérias (Thajuddin & Subramanian, 2005).

1.6.1.1 Nutrição humana

A utilização de cianobactérias na alimentação humana tem vindo a aumentar em alguns países. Reconhece-se que os compostos, para além de atuarem como suplementos nutricionais, são de fácil digestibilidade e melhoram a viabilidade das bactérias probióticas (Pulz & Gross, 2004; Gantar & Svirčev, 2008).

O género *Aphanizomenon* tem sido utilizado para consumo humano há várias décadas sendo atualmente produzido em muitos países, constituindo uma parte significativa da indústria de suplementos alimentares da América do Norte (Bishop & Zubeck, 2012). Apresenta um elevado conteúdo do pigmento ficocianina-c, que tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Schaeffer *et al.*, 1999). Estirpes de *Spirulina*, *Anabaena* e *Nostoc* são já consumidas como alimento humano em

países como o Chile, México, Peru e Filipinas e são comercializadas na forma de pós, flocos, cápsulas e comprimidos/pastilhas (Abed *et al.*, 2009).

Entre a variedade de ácidos gordos, os polinsaturados (PUFAs - *Polyunsaturated fatty acids*) são de grande importância devido aos seus benefícios para a saúde e a sua crescente procura no mercado global (Cardozo *et al.*, 2007).

Os carotenóides desempenham papéis multifuncionais como corantes naturais (tal como as ficobiliproteínas), precursores de pigmentos visuais e contribuem para melhorar o estado antioxidante do consumidor (Guedes *et al.*, 2013a). O β -caroteno e os seus derivados podem atuar como precursores do ácido retinóico, retinal e vitamina A, melhorando o valor nutricional, a visão e a diferenciação celular de mamíferos (Seino *et al.*, 2008). É usado em margarinas, queijos, sumos de fruta, bolos, produtos lácteos, produtos enlatados e de confeitaria. A astaxantina é um pigmento carotenóide usado como corante alimentar e tem uma forte atividade antioxidante (Snodderly, 1995), com evidências de ser superior á de outros carotenóides e à das vitaminas C e E (Singh *et al.*, 2017b). Tem sido reportado que os carotenóides são eficazes contra patologias como o cancro e a diabetes, assim como em doenças neurodegenerativas tal como Alzheimer e Parkinson (Vílchez *et al.*, 2011).

Os polissacáridos têm utilizações muito versáteis na indústria alimentar como o revestimento de alimentos, emulsionantes, agentes gelificantes e floculantes (Usman *et al.*, 2017).

As cianobactérias têm também a capacidade de produzir vitaminas necessárias à dieta humana como a A, Bs, C, D e E e alguns elementos fundamentais como potássio, zinco, magnésio, cobre, etc. Também são produtores de aminoácidos essenciais e de ómega 3 e 6 (Bishop & Zubeck, 2012).

1.6.1.2 Nutrição animal

O uso de microalgas e cianobactérias na dieta de animais começa a ter alguma expressão. A sua utilização na alimentação de ruminantes induz um aumento dos níveis de ácido docosaexaenóico (DHA) e ácido linoleico conjugado na gordura do leite, enquanto diminui os ácidos gordos saturados, isto devido aos ácidos gordos polinsaturados presentes nestes organismos (Christaki *et al.*, 2011).

De um ponto de vista nutricional, os esteróis produzidos pelas cianobactérias são boas fontes dietéticas para organismos de aquacultura, principalmente na fase larvar (Volkman, 2003) e a astaxantina é normalmente usada como aditivo alimentar para o salmão, truta e camarão em muitas produções de aquacultura (Figura 1.7), em que altera a cor da carne destes animais, e na indústria das aves (de capoeira/domésticas), em que torna a cor da gema do ovo mais intensa (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).



Figura 1.7. – Diferença da pigmentação de um filete de truta alimentada com milho normal (esquerda) e um filete de truta alimentada com milho suplementado com astaxantina (direita)(Adaptado de Breitenbach *et al.*, 2016).

1.6.2 Indústria farmacêutica

As potenciais aplicações na área da indústria farmacêutica passam, maioritariamente, pela produção de toxinas e de compostos, cujas moléculas apresentam atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, anticoagulante, anticonvulsiva e imunomoduladora (Vijayakumar & Menakha, 2015).

Os fitóis podem aumentar a resposta imunológica contra tumores numa fase inicial da carcinogénese e também atuam como agentes anti-inflamatórios (Silva-Stenico *et al.*, 2011).

As ficobiliproteínas são usadas em diagnósticos clínicos como indicadores sensíveis à fluorescência (Gouveia *et al.*, 2008).

Os polissacáridos apresentam propriedades imunomodulatórias, antibacterianas, anticoagulantes, antimutagénicas, radioprotetoras, anticancerígenas e anti-inflamatórias (Mišurcová *et al.*, 2015) e a sua natureza aniónica torna-os interessantes para outras aplicações no ramo biomédico (de Jesus Raposo *et al.*, 2015).

Entre a variedade de ácidos gordos, os polinsaturados (PUFAs) são de grande importância em algumas práticas medicinais face às suas atividades biológicas, tornando-os valiosos na cura da obesidade e doenças cardiovasculares (Cardozo *et al.*, 2007).

Os carotenóides contribuem para melhorar o estado antioxidante, pois este tem um efeito positivo na prevenção e controlo do crescimento de determinados tumores (Guedes *et al.*, 2013a) e também fornecem proteção contra a aterosclerose ao inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL) (Sanchez & Demain, 2008). A astaxantina tem, já descrita, uma ação significativa no aumento da produção de imunoglobulina A, M e G e na produção dos anticorpos *T-helper* (Dufossé *et al.*, 2005).

1.6.3 Indústria cosmética

A área da cosmética também tem desenvolvido aplicações comerciais com as cianobactérias. Atualmente, estas são utilizadas como fontes de proteínas, colagénio, pigmentos, vitaminas e outros, que são incorporados em produtos faciais, capilares e dermatológicos (Jahan *et al.*, 2017).

Os compostos foto-protetores, tal como os MAA e a SCY, têm sido comercialmente explorados para a proteção da pele principalmente como protetores solares (Bandaranayake, 1997; Rastogi *et al.*, 2015).

As ficobiliproteínas são muito utilizadas neste tipo de indústria, principalmente como substitutos de tintas sintéticas (Pulz & Gross, 2004).

Um dos géneros mais estudados e explorados em relação ao seu potencial para a indústria cosmética é o género *Spirulina*, nomeadamente em produtos como sérums e cremes. Outro género de cianobactéria com este tipo de aplicações é o género *Aphanizomenon*, particularmente a espécie *Aphanizomenon flos-aquae*, utilizado em argilas faciais, batons e vernizes (Bavini, 2018).

1.6.4 Indústria ambiental

As cianobactérias apresentam várias aplicações biotecnológicas nesta área. Entre elas destaca-se a produção de biofertilizantes, utilizando espécies de cianobactérias fixadoras de azoto. Estas são inoculadas em culturas de tomate, algodão, arroz, alface, entre outras, aumentando a sua resistência e produtividade (Abed *et al.*, 2009).

Diferentes géneros de cianobactérias acumulam e libertam, significativamente, um amplo grupo de fitohormonas incluindo auxinas, giberelinas, citoquinas e etileno, que estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas (Gayathri *et al.*, 2015). Numerosos reguladores do crescimento de plantas, como aminoácidos, açúcares e vitaminas, têm também sido isolados a partir de diferentes géneros de

cianobactérias. Estes compostos podem ser comercialmente aplicados em terrenos agrícolas para aumentar a produtividade das colheitas (Karthikeyan *et al.*, 2007).

Diversas cianotoxinas exibem várias bioatividades e podem servir como inseticidas, herbicidas, algicidas e fungicidas, pois mostram uma resposta inibitória no crescimento de microorganismos como bactérias, vírus, fungos, alguns invertebrados como camarões e bivalves e alguns vertebrados como peixes, aves e mamíferos (Isman, 2006). Têm um grande potencial para o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos que podem ser aplicados em campos de colheita (Berry *et al.*, 2008).

Por outro lado, as cianobactérias são também benéficas no tratamento de águas residuais, pois podem contribuir para a sua oxigenação e mineralização, reduzindo os níveis de certas substâncias como cloretos e fenóis (El-Bestawy, 2008). Está demonstrado que estes organismos podem ser utilizados como fixadores de metais presentes na água pois contêm sideróforos que atuam na captação de ferro, fixando-o na membrana e evitando assim a sua perda por diluição em ambientes marinhos (Gademann & Portmann, 2008). Podem ser utilizadas em condições de toxicidade metálica aguda e crónica, bem como em outras áreas desde biomateriais a biossensores (Gademann, 2007). Os polissacáridos são particularmente utilizados no campo da biorremediação para remover metais tóxicos de águas poluídas (Mišurcová *et al.*, 2015).

Na presença de abundantes fontes de carbono, as cianobactérias acumulam PHA (Figura 1.8), um termoplástico cristalino com propriedades comparáveis às do polipropileno, que pode ser utilizado para produzir plásticos biodegradáveis (Anderson & Dawes, 1990).

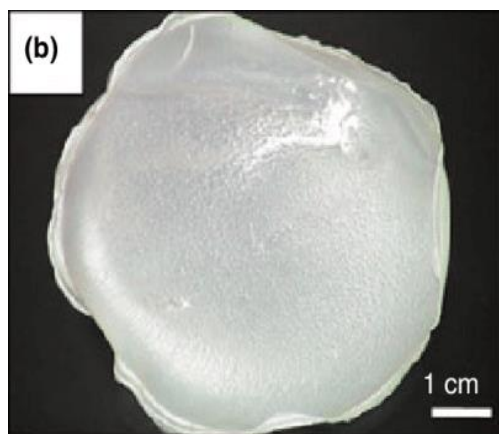
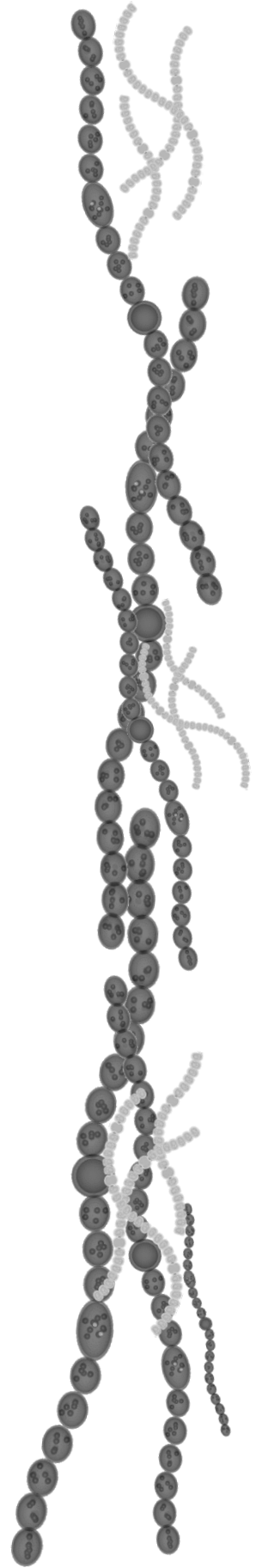


Figura 1.8. – Filme de PHA fundido a partir de solvente em que os grânulos de PHA foram dissolvidos (Adaptado de Abed *et al.*, 2009).

Têm sido também estudadas como futuras fontes alternativas de energia devido à produção biológica de hidrogénio, que seria uma alternativa ecológica e eficiente aos combustíveis fósseis, devido à sua renovação e ausência de emissões de dióxido de carbono (Angermayr *et al.*, 2009). Mais de 14 géneros de cianobactérias são conhecidos pela sua capacidade de produzir este gás em diferentes condições de cultura, incluindo *Microcystis*, *Anabaena* e *Nostoc* (Lindblad, 1999; Dutta *et al.*, 2005). Os terpenóides estão a emergir como precursores de biocombustível e estão a ser testados para substituírem o “diesel” biossintético no mercado mundial (Cheng *et al.*, 2007).

Os MAA têm sido explorados para utilização em materiais não-biológicos como aditivos fotoestabilizadores em vernizes, tintas e plásticos (Rastogi *et al.*, 2010).

2. Objetivos

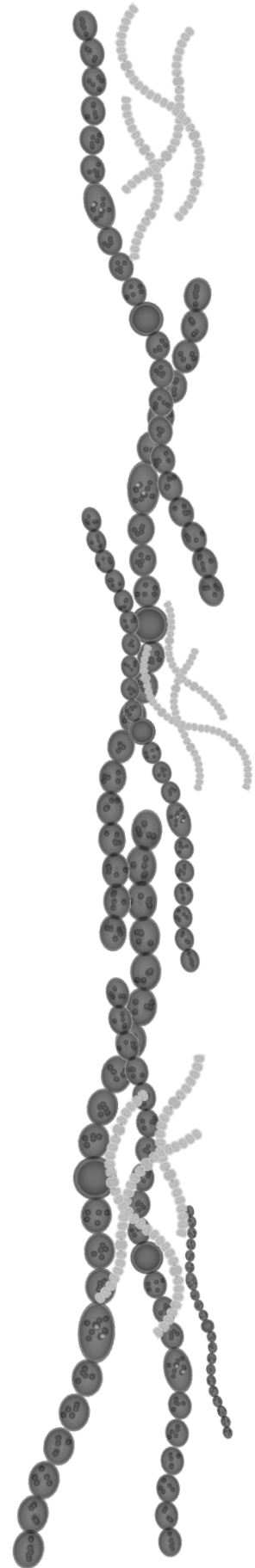


A temática da exploração dos metabolitos secundários de cianobactérias com potencial atividade biológica tem vindo a ganhar cada vez mais atenção e cada vez mais estirpes estão a ser consideradas para tal. De entre as potencialidades das cianobactérias destaca-se a atividade antioxidante, que pode ser usada em várias áreas biotecnológicas. No entanto, são ainda restritas as estirpes que têm sido investigadas relativamente a este potencial.

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização do perfil antioxidante de várias estirpes de cianobactérias isoladas de ambientes de água doce portugueses diversificados. Especificamente pretendeu-se:

1. Produzir extratos de sete estirpes de cianobactérias isoladas de várias albufeiras e de uma estirpe isolada de uma ETAR (mantidas nas coleções de culturas de microalgas “*Estela Sousa e Silva Algae Culture Collection*” e “LEGE-CC”, respetivamente);
2. Caracterizar o perfil antioxidante desses extratos através de ensaios químicos;
3. Avaliar o efeito protetor desses extratos contra a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogénio na linha celular humana HEK293T;
4. Identificar estirpes/espécies de cianobactérias como fontes naturais de compostos antioxidantes com potencial biotecnológico.

3. Materiais e métodos



3.1 Material biológico e produção de biomassa

O trabalho experimental foi realizado de acordo com o esquema seguinte (Figura 3.1).

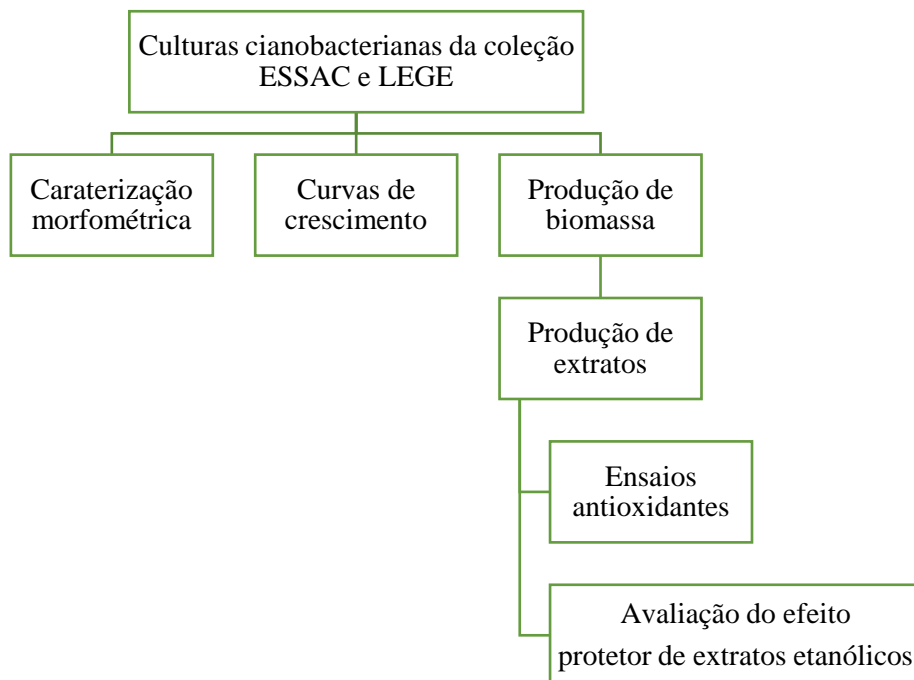


Figura 3.1 – Esquema da ordem de realização do trabalho experimental.

3.1.1. Estirpes de cianobactérias

Neste trabalho foram usadas 7 estirpes de cianobactérias, isoladas de várias albufeiras portuguesas e pertencentes à coleção de culturas de algas “*Estela Sousa e Silva Algae Culture Collection*” (ESSACC - Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia/INSA) (Paulino *et al.*, 2009), e uma estirpe isolada da ETAR de Febros e mantida na coleção “*Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection*” (LEGE) (<http://lege.ciimar.up.pt>) do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) (Martins *et al.*, 2011) apresentadas na tabela 3.1. Foram selecionadas estirpes cianobactérias cuja bioatividade tem vindo a ser estudada. Estas foram previamente caraterizadas como não sendo produtoras de toxinas, estando também referidas em outros trabalhos.

As estirpes de cianobactérias foram mantidas em meio de cultura Z8 (Anexo II), a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, num ciclo de luz/escurecimento de 14/10h com uma intensidade de luz de $16 \pm 4 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabela 3.1. - Estirpes de cianobactérias utilizadas e sua origem.

Estirpes de cianobactérias		Origem	
Espécie	Código da estirpe	Local de isolamento	Ano de isolamento
<i>Anabaena flos-aquae</i>	LMECYA 180	Rio Guadiana, Vitonogales	1999
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 088	Albufeira de Montargil	1999
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 009	Albufeira do Peneireiro	1996
<i>Leptolyngbya sp.</i>	LMECYA 173	Fonte hidrotermal	2003
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 127	Albufeira de Montargil	2000

<i>Nostoc sp.</i>	LMECYA 291	Solo (canteiro), Lisboa	2013
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 257	Albufeira de S. Domingos	2009
<i>Planktothrix mougeotii</i>	LEGE 06224	Coleção LEGE - WWTP	2006

3.1.2. Caraterização morfométrica

A caraterização morfométrica das estirpes foi realizada em amostras colhidas ao longo do período de crescimento e fixadas com solução de Lugol 1%, através da observação em microscópio ótico invertido com contraste de fase (*Olympus CK40*, Tóquio, Japão) e microscópio com aquisição de imagem (*Olympus BX60* e câmara *CCD Olympus DP11*, Tóquio, Japão). As fotografias das estirpes foram processadas no software informático *Image J* (versão 64-bit Java 1.0.0_112) para medição das dimensões das células vegetativas (largura e comprimento; $n = 30$ células) e das células especializadas (heterocistos e acinetos) quando existentes. Adicionalmente, caraterísticas como a forma das colónias, presença ou ausência de vacúolos gasosos e outras caraterísticas distintivas das espécies foram também registadas.

3.1.3. Quantificação celular

A quantificação celular de cianobactérias foi realizada por microscopia ótica (microscópio *Olympus CK40*, Tóquio, Japão). Em todas as estirpes (exceto *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* e *Nostoc sp.*), utilizou-se uma câmara *Sedgewick-Rafter* (ampliação 100x) e determinou-se o comprimento total dos filamentos (expresso em nº de divisões da escala micrométrica da ocular) em 10 quadrículas (correspondendo a 10 μL) escolhidas aleatoriamente (Figura 3.2a). O comprimento total dos filamentos foi convertido em μm , tendo em conta o fator de conversão da objetiva (1 divisão = 10,3 μm).

A medição das dimensões das células foi realizada através da análise de fotografias das estirpes, com recurso ao software *Image J*, tal como referido em 3.1.2. Para cada estirpe, o número de células foi calculado através da divisão do comprimento total dos filamentos pelo comprimento médio das respetivas células. A concentração celular, expressa em células por mililitro, foi obtida após aplicação dos fatores de correção do volume da câmara e da diluição da amostra.

Nas estirpes *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* e *Nostoc sp.*, utilizou-se uma câmara *Fuchs-Rosenthal* (Figura 3.2b), pipetando o volume de cultura necessário para cobrir os 2 campos de contagem da câmara (ampliação 200x). Determinou-se o número de células em 4 quadrados de 1mm² de área na diagonal em cada campo (8 quadrados no total). A concentração celular (células/mL) foi calculada tendo em conta o fator de correção de volume de 5000 e a diluição da amostra.

No caso da estirpe *Nostoc sp.*, foi necessário um passo de sonicação (*Sonics Vibra Cell VCX 500*, Connecticut, EUA) prévio à fixação em Lugol e contagem celular de forma a libertar as células da camada gelatinosa envolvente.

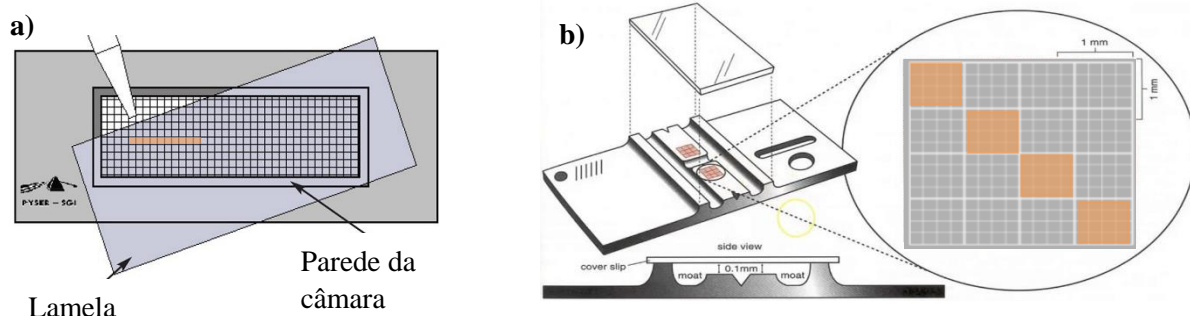


Figura 3.2 - Diferentes câmaras utilizadas na contagem microscópica de células; **a)** câmara *Sedgewick-Rafter*, **b)** câmara *Fuchs-Rosenthal* (Adaptado de: **a)** https://www.emgrid.com.au/wp-content/uploads/Sedgewick_rafter-6.jpg; **b)** https://lh6.googleusercontent.com/9lM51D00IUowK0XYDhDzqiLgK3LRnIGu27zuebVznd9N3o83IsdRnINk28y6L5v3qL4uzjMJhGwNX0BIFx5o75gYZdF_UMxWGB0ZoSIddH7_pCRzXZttDIBWBMn6bTaGZw=s412) (Ambos acedidos a 23 de Maio de 2019).

3.1.4. Curvas de crescimento

A construção das curvas de crescimento envolveu os seguintes passos:

1. Uma vez conhecida a concentração celular das culturas *stock* das estirpes em estudo, pelo procedimento atrás referido, determinou-se o volume de cultura necessário para inocular *T-flasks* de 75 cm² de área (com 100 mL de meio Z8 – Anexo II) com concentrações iniciais de 1x10⁵ e 5x10⁵ células/mL, correspondendo ao ponto inicial da curva de crescimento (T0). A concentração inicial de 1x10⁵ cél/mL apenas foi utilizada nas estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMACYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMACYA 088), pois verificou-se que a fase de adaptação (fase *lag*) foi muito extensa, prolongando excessivamente todo o ciclo de crescimento;
2. Periodicamente, foram recolhidos 2 mL das culturas inoculadas para:
 - A. Leitura espectrofotométrica a 450 nm (Schrader *et al.*, 1997; Churro *et al.*, 2009), em triplicado, em microplaca de 96 poços (*Multiskan Ascent* – Thermo Labsystems, Helsínquia, Finlândia);
 - B. Contagem celular (3.1.3);
 - C. Aquisição de fotografias (*Olympus BX60*, com câmara *Olympus PM-PB20*, Tóquio, Japão) para medição das dimensões celulares (3.1.2);
3. Traçaram-se curvas de crescimento com os resultados das contagens celulares e das leituras de absorvância de cada estirpe, ao longo do período de amostragem.
4. Calculou-se a taxa de crescimento e o tempo de duplicação para cada estirpe, com base nos valores, em triplicado, de absorvância a 450nm.

3.1.5 Produção de biomassa

Para a execução dos testes da atividade antioxidante, foi necessário, previamente, obter a biomassa de cianobactérias. Para tal, realizou-se o crescimento das estirpes em larga escala, a partir de inóculos de 100 mL de cada cultura. Após aproximadamente 2 semanas, inocularam-se dois balões de 6L por estirpe, com 5L de meio Z8 (tabela 8.2, Anexo II). Os balões mantiveram-se em condições controladas de luz e temperatura (40 µE.m⁻².s⁻¹), com ciclo de luz/escurecimento de 14h/10h, a 22 ± 2°C, com arejamento,

durante aproximadamente um mês. Após este período, as culturas foram decantadas durante 24h e posteriormente centrifugadas para concentração da biomassa (10000 rpm, 5 minutos a 4°C; *Beckman J2-21 M/E*, Califórnia, EUA). A biomassa resultante foi congelada a -20°C e posteriormente liofilizada (*Thermo Scientific Savant Speedvac AES 1000*, Massachusetts, EUA) durante períodos variáveis de tempo, consoante o conteúdo líquido presente nas amostras. Os liofilizados foram reduzidos a pó, com o auxílio de uma vareta de vidro, pesados numa balança analítica (*Mettler H10 W*, Columbus, EUA) e armazenados a -20°C até utilização.

3.1.6. Extração da biomassa

Os métodos para a extração da biomassa das cianobactérias foram otimizados em relação ao solvente de extração, à razão amostra:solvente e concentração final de extratos. Numa primeira fase, utilizaram-se 3 réplicas com cerca de 0,5 g de biomassa liofilizada das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), pesadas numa balança analítica (*Mettler Toledo XP205 Delta Range*, Columbus, EUA) com $\pm 0,01$ mg de precisão. Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto para análise (*EMPARTA® ACS*, Merck, Darmstadt, Alemanha) e as soluções foram agitadas manualmente e depois no vórtex. De seguida, colocaram-se os tubos com as amostras num agitador compacto (*Edmund Bühler GmbH modelo KS-15*, Hechingen, Alemanha), durante 30 minutos a 350 rpm. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 3100 rpm durante 10 minutos, numa centrífuga (*Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3 Free-Standing Centrifuge*, Massachusetts, EUA). Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e evaporou-se completamente o solvente utilizando uma pêra de evaporação (pesada anteriormente vazia) e um evaporador rotativo até apenas resultar o resíduo seco proveniente da extração (*Büchi modelo R-210*, Labortechnik, Suíça) a 35 °C. De seguida, pesou-se a pêra de evaporação e fez-se a diferença para quantificar o resíduo seco extraído. Posteriormente, procedeu-se à diluição do resíduo seco, com o solvente utilizado na extração, a 1, 3 e 5 mg de extrato/ mL. Até posterior utilização, os extratos foram acondicionados em arca congeladora a -80 °C. Os resultados das concentrações de 3 e 5 mg/mL não foram utilizados devido às leituras de absorvâncias, que se desviaram da linearidade, pelo que não estão incluídos no capítulo “Resultados”, mas apresentam-se no anexo III.

Para as estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291), realizaram-se extrações só com metanol (*Supelco Prepsolv®*, Merck, Darmstadt, Alemanha). Pesaram-se 3 réplicas de cerca de 0,5 g de biomassa liofilizada das estirpes referidas, para tubos de 50 mL e acrescentou-se 20 mL de metanol. Procederam-se aos passos de homogeneização, centrifugação, evaporação e diluição descritos anteriormente. Os resultados dos ensaios antioxidantes desta extração não estão incluídos neste trabalho pois as concentrações de 5 e 3 mg/mL não são equiparáveis em todas as estirpes de cianobactérias estudadas, mas apresentam-se no anexo IV.

Devido às questões mencionadas anteriormente, produziram-se extratos etanólicos e metanólicos numa concentração final de 1 mg/mL de todas as estirpes de cianobactérias. Dependendo da biomassa disponível, partiu-se de uma biomassa liofilizada de aproximadamente de 0,5g em tubos de 15 mL e acrescentou-se 10 mL de etanol e 10 mL de metanol. Os passos seguintes até à diluição foram repetidos de acordo com os descritos anteriormente.

Só serão apresentados os resultados da concentração de 1 mg/mL, pois é a única concentração de extratos etanólicos e metanólicos cujos resultados foi possível de comparar entre todas as estirpes.

Os resultados pormenorizados dos ensaios antioxidantes de todos os extratos a 1 mg/mL de todas as estirpes encontram-se descritos no anexo V.

3.2 Caracterização do perfil antioxidante de cianobactérias

O perfil antioxidante das oito estirpes de cianobactérias foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros:

- Ensaio do sistema de inibição do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil);
- Ensaio da determinação do conteúdo total em compostos fenólicos;
- Ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides;
- Ensaio do branqueamento do β -caroteno.

Antes da realização dos ensaios antioxidantes com os extratos cianobacterianos, foi necessário construir retas de calibração para cada um dos ensaios ($R^2 \geq 0,995$), com exceção do ensaio de branqueamento do β - caroteno.

3.2.1 Ensaio do sistema de inibição do radical DPPH

O radical DPPH é um radical orgânico de azoto, muito utilizado comercialmente devido à sua estabilidade. Apresenta um máximo de absorvância de luz UV-vis aos 515 nm. Observa-se a redução deste radical quando existem compostos com atividade antioxidante presentes. Durante esta redução é possível observar a alteração da cor da solução de violeta para amarelo após um tempo de reação de 30 minutos (Huang *et al.*, 2005).

O método utilizado foi adaptado do descrito por Moure *et al.*, (2001). Para a construção da reta de calibração utilizou-se padrões de *Trolox* ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid 97%, *Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA), com concentrações entre 10 e 175 $\mu\text{g/mL}$ de metanol. As absorvâncias foram depois comparadas com as das amostras testadas e o resultado foi expresso em $\mu\text{g ET}$ (Equivalentes de *Trolox*)/mL de extrato. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) com a concentração de 14,6 $\mu\text{g/mL}$. Para a realização deste ensaio, utilizaram-se 2 mL desta solução à qual se adicionaram 50 μL dos extratos de cada estirpe de cianobactérias, e no caso do branco, 50 μL do solvente em que a amostra estava diluída. Fizeram-se 3 réplicas de cada amostra (incluindo o branco), que foram mantidas no escuro durante 30 minutos. No final da reação, mediu-se a absorvância a 515 nm contra o solvente, em que a amostra estava diluída, num espectrofotómetro (*Thermo Scientific X1 Evolution 300 Local*, Massachusetts, EUA) e calculou-se a percentagem de inibição (*IP – Inhibition Percentage*), recorrendo à equação 1 (Moure *et al.*, 2001).

Equação 1:

$$IP (\%) = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Ab – absorvância do branco após 30 minutos;

Aa – absorvância da amostra após 30 minutos.

3.2.2. Ensaio da determinação do conteúdo total em compostos fenólicos

A dissociação de um próton fenólico leva à formação de um anião fenolato, que é capaz de reduzir o reagente *Folin-Ciocalteu* (FC), o que indica que esta reação ocorre através de mecanismos de transferência de eletrões. O reagente FC é um oxidante que atrai um eletrão do composto com atividade antioxidante, causando mudanças na cor da solução. O grau da mudança de cor é proporcional à concentração de compostos com atividade antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

O método utilizado para a realização do ensaio da determinação dos compostos fenólicos totais foi baseado no método descrito por Erkan *et al.*, (2008). Na construção da reta de calibração utilizou-se o

ácido gálico (*Gallic acid* 97.5-102.5% (*titration*), *Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA), como padrão, com concentrações entre 0,025 e 0,2 mg/mL de água Milli-Q e os resultados foram apresentados em mg EAG (Equivalentes de Ácido Gálico)/g de extrato.

Para a realização deste ensaio, preparou-se uma solução *stock* de ácido gálico com concentração de 10 mg/mL, uma solução aquosa de carbonato de sódio para análise (*Sodium carbonate anhydrous EMSURE® ISO, Merck*, Darmstadt, Alemanha) de 60 mg/mL e uma solução aquosa de FC (*Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Merck*, Darmstadt, Alemanha) 1:10, v/v. Adicionou-se 1 mL dos extratos a 7,5 mL da solução de FC e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, adicionaram-se 7,5 mL da solução de carbonato de sódio e incubou-se no escuro durante 2 horas, à temperatura ambiente. Passado este período, mediram-se as absorvâncias a 725 nm, contra o solvente em que as amostras estavam diluídas. A concentração de EAG é calculada de acordo com a equação 2 (Erkan *et al.*, 2008).

Equação 2:

$$C = c \times vf \times \frac{ve}{m}$$

Onde:

C – Conteúdo Total de Compostos Fenólicos (mg/g)

c – Concentração de Ácido Gálico (mg/mL)

vf – Volume de Extrato (mL)

ce – Concentração do Extrato (mg/mL)

ve – Volume de Extração (mL)

m – Toma da Amostra (g)

3.2.3. Ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides

O método utilizado para a realização deste ensaio foi baseado no método descrito por Yoo *et al.* (2008), com a exceção da reta de calibração, tendo sido utilizada uma solução etanólica de quercetina (*Quercetin solid for HPLC ≥95%, Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) como padrão, com concentrações entre 0,1 e 0,7 mg/mL. Os resultados são apresentados em mg EQR (Equivalentes de Quercetina)/g de amostra, sendo calculados pela equação 2 (substituindo C por Conteúdo Total de Flavonóides e c por concentração de Quercetina).

Foram preparadas soluções aquosas de nitrato de sódio para análise (*Sodium nitrate EMSURE® ACS, ISO, Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) a 5 % (p/v), cloreto de alumínio a 10 % (p/v) (*Aluminum chloride anhydrous, Merck*, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de sódio para análise (*Sodium hydroxide EMSURE® ACS, Merck*, Darmstadt, Alemanha) 1 M. Em tubos de 15 mL, adicionou-se 1 mL dos extratos, 4 mL de água Milli-Q e 0,3 mL da solução de nitrato de sódio. Os tubos foram colocados no vórtex para homogeneizar e de seguida, deixou-se reagir durante 5 minutos. Adicionaram-se 0,6 mL da solução de cloreto de alumínio, homogeneizou-se e deixou-se reagir durante 6 minutos. Por fim, adicionaram-se 0,2 mL da solução de hidróxido de sódio e 2,3 mL de água Milli-Q. A absorvância foi medida a 510 nm contra o solvente em que a amostra estava diluída.

3.2.4. Ensaio do branqueamento do β-caroteno

Este método foi adaptado de Miller (1971) e para tal, preparou-se uma solução de β-caroteno (*β-carotene ≥97.0% (UV), Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) em clorofórmio para análise (*Chloroform EMSURE® ACS, ISO, Merck*, Darmstadt, Alemanha) de concentração 0,2 mg/mL. Num balão de evaporação adicionaram-se 20 mg de ácido linoleico (*Linoleic acid ≥99%, Sigma-Aldrich*, Missouri,

EUA), 200 mg de *Tween®40* (*Tween®40 viscous liquid, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA*) e 1 mL da solução de β -caroteno (para um volume final de 50 mL – os volumes foram ajustados conforme o volume de extrato a testar) e evaporou-se o clorofórmio a 40°C num evaporador rotativo. Acrescentaram-se 50 mL de água *Milli-Q* e agitou-se de maneira a criar uma emulsão. Colocaram-se 0,2 mL dos extratos em tubos de 15 mL e juntou-se 5 mL da emulsão de β -caroteno. Os tubos controlo continham 0,2 mL do solvente em que as amostras estão diluídas e 5 mL da emulsão. Mediu-se a absorvância dos controlos a 470 nm e de seguida todos os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 50 °C durante 2 horas. Passado este período, a absorvância de todos os tubos foi medida e calculou-se o coeficiente da atividade antioxidante (AAC – *Antioxidant Activity Coefficient*) através da equação 3 (Miller 1971).

Equação 3:

$$AAC = \frac{AA-AC2}{AC0-AC2} \times 1000$$

Onde:

AAC – Coeficiente de Atividade Antioxidante

AA – Absorvância da Amostra

AC0 – Absorvância do Controlo no tempo inicial

AC2 – Absorvância do Controlo após 2 horas

Os resultados foram estatisticamente tratados através do software IBM SPSS Statistics (versão 25.0) Os dados cumprem uma distribuição normal e foi aplicado o teste One Way ANOVA com os testes de Duncan e Tukey e as diferenças consideraram-se estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.3. Avaliação do efeito protetor de extratos cianobactérias em células HEK293T expostas a peróxido de hidrogénio

3.3.1 Exposição da linha celular HEK293T a extratos de cianobactérias e a H₂O₂

O potencial efeito protetor dos extratos das cianobactérias contra a citotoxicidade de H₂O₂ foi avaliado *in vitro*, usando como modelo celular as células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293*) (Figura 3.3). Esta linha celular apresenta um rápido crescimento e fácil manutenção (Thomas & Smart, 2005), pelo que é adequada como modelo para avaliar os efeitos de antioxidantes e tem sido amplamente utilizada em estudos de biologia celular desde há muitos anos (Boonpeng *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015; Dumont *et al.*, 2015; Stepanenko & Dmitrenko, 2015; Athmouni *et al.*, 2018).

As células HEK293T crescem aderentes a uma matriz, formando uma monocamada celular na superfície de crescimento. No entanto, para reforçar a adesão celular, é comum realizar-se um pré-tratamento dessa superfície com Poli-L-Lisina. Para tal colocou-se 100 μ L de uma solução de Poli-L-Lisina (*Poly-L-lysine 0,01% solution, Merck, Darmstadt, Alemanha*) (10% em PBS) em cada poço de microplacas de 96 poços. Incubou-se a 37°C numa estufa humidificada com 5% CO₂ durante 1 hora. Após este tempo, a solução foi removida e as microplacas foram colocadas novamente na estufa durante 1h para secagem da solução remanescente nos poços.

Para a obtenção de uma suspensão das células HEK293T, tripsinizou-se um frasco de cultura desta linha celular previamente inoculado (cedido pela Unidade de Citogenética do Instituto Nacional de Saúdo Doutor Ricardo Jorge). Adicionou-se 6 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA*) 1x, suplementado com 4,5 g/L glucose, glutamax,

antimicoplasma (*Plasmocin*[™], *InvivoGen*, Califórnia, EUA) e 10% de soro fetal de bovino (*Fetal Bovine Serum*, *Merck*, Darmstadt, Alemanha), diluiu-se a suspensão celular (1/2) com uma solução de azul de tripano (*Trypan Blue solution 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture*, *Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) e procedeu-se à determinação da concentração celular através do método de exclusão do azul de tripano (Louis & Siegel, 2011). Este corante penetra nas células não-viáveis, corando-as de azul, mas a membrana das células viáveis é impermeável a este corante, pelo que não adquirem essa coloração (Figura 3.4). A contagem das células foi feita ao microscópio com recurso a uma câmara *Neubauer* (Figura 3.5). Contaram-se as células viáveis em cada quadrado de cada quadrante (Q1, Q2, Q3 e Q4) e o número de células foi calculado de acordo com a equação 4.

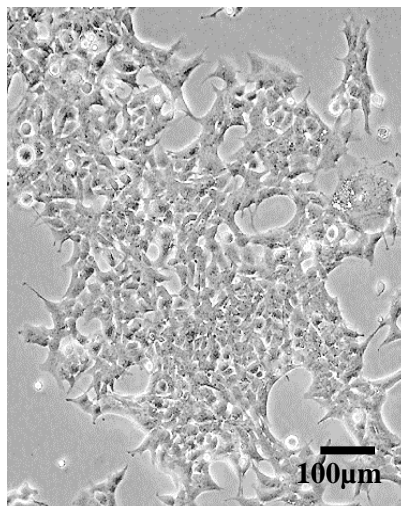


Figura 3.3. - Células HEK293 (Fonte: <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CRL-1573.ashx>) (Acedido a: 23

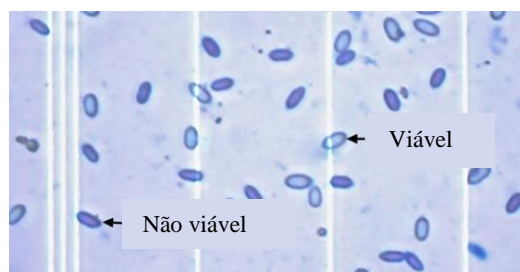


Figura 3.4 - Representação de células viáveis e não viáveis no método de exclusão do azul de tripano (Fonte: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2013/viability/image/viability1.jpg>) (Acedido a 4 de Agosto de 2019).

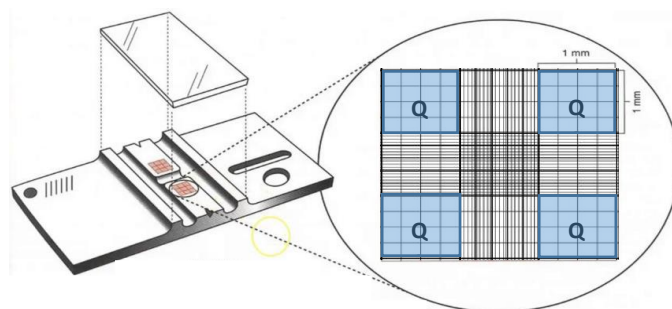


Figura 3.5 - Representação de uma câmara de *Neubauer* e campo de contagem de células (Fonte: <https://i.ytimg.com/vi/Xth6q4LYwQ0/maxresdefault.jpg>) (Acedido a 3 de Agosto de 2019).

Equação 4:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \frac{\text{somatório das células nos 4 quadrantes}}{4 \text{ (quadrantes)}} \times 10000 \times d$$

Em que:

- 10000 corresponde ao fator de correção do volume;
- *d* corresponde à diluição da suspensão celular.

De acordo com a concentração obtida, diluiu-se a suspensão celular em meio de cultura DMEM (suplementado) de forma a obter uma suspensão celular com 6×10^4 células/mL. Colocou-se 100 μL desta solução em cada poço de 3 microplacas de 96 poços. As microplacas foram colocadas numa estufa a 37°C, humidificada e com 5% CO_2 , durante 24 horas para permitir que as células aderissem à superfície e iniciassem o seu crescimento. Após este período, cada microplaca foi sujeita a um diferente tipo de exposição aos extratos etanólicos de cianobactérias e ao H_2O_2 de acordo com as tabelas 3.2 e 3.3. Cada condição de exposição, para cada microplaca, foi testada em triplicado. Todos os procedimentos envolvendo o manuseamento das culturas celulares e dos reagentes respetivos foram realizados em condições de esterilidade e numa câmara de fluxo laminar *Bio Hazard* (segurança biológica nível 2).

Tabela 3.2. – Condições de exposição das células HEK293T aos extratos cianobacterianos e H_2O_2 em microplacas de 96 poços.

	Condição de exposição	Extratos cianobacterianos		H_2O_2		Controlos
		Concentração final/poço	Incubação	Concentração final/poço	Incubação	
Placa 1	Exposição curta aos extratos e H_2O_2	10 $\mu\text{g/mL}$	1 h	0.1 mM	3 h	<ul style="list-style-type: none"> • Negativo: meio de cultura • Solvente: meio de cultura + etanol absoluto anidro (concentração final de 1%) • Positivo: H_2O_2 (diferentes concentrações) • Positivo + Solvente • Extratos: extratos cianobacterianos em meio de cultura numa concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$
Placa 2	Exposição longa aos extratos e curta ao H_2O_2		23 h	1 mM	3 h	
Placa 3	Exposição curta aos extratos e longa ao H_2O_2		1 h	0.1 mM	23 h	

Tabela 3.3. – Esquema da exposição células HEK293T aos extratos cianobacterianos e H_2O_2 em microplacas de 96 poços.

	Extratos cianobacterianos (10 $\mu\text{g/mL}$)			Extratos cianobacterianos (10 $\mu\text{g/mL}$) + H_2O_2 (0,1 ou 1 mM) (co-incubação)			Extratos cianobacterianos (10 $\mu\text{g/mL}$) + H_2O_2 (0,1 ou 1 mM) (lavagem)			Controlos		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	LMECYA 009	Controlo Negativo		
B	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088	LMECYA 088			
C	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	LMECYA 127	Controlo Solvente		
D	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173	LMECYA 173			
E	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	LMECYA 180	Controlo Positivo		

F	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257	LMECYA 257			
G	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	LMECYA 291	Controlo Positivo + Solvente		
H	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224	LEGE 06224			

O procedimento da exposição das células aos extratos, H₂O₂ e controlos foi o seguinte:

1. Após adesão das células à superfície de crescimento, descartou-se o meio de cada poço;
2. Nos poços 1, 2, 3, 7, 8 e 9 (A-H) adicionou-se 200 µL das soluções dos extratos das diferentes estirpes em meio de cultura (10µg/mL);
3. Nos poços 4, 5 e 6 (A-H) adicionou-se 190 µL dessas soluções;
4. Nos poços A10, 11 e 12 adicionou-se 200 µL de meio de cultura;
5. Nos poços C10, 11, 12 adicionou-se 200 µL da solução de meio de cultura com etanol (1% v/v);
6. Nos poços G10, 11, 12 adicionou-se 190 µL da solução meio de cultura com etanol (1% v/v);
7. A microplaca foi incubada numa estufa a 37°C humidificada com 5% CO₂ durante 1 hora (microplacas 1 e 3) ou durante 23 horas (microplaca 2);
8. Adicionou-se 10 µL da solução de H₂O₂ preparada em meio de cultura (0.1 mM, concentração final, microplacas 1 e 3; 1 mM, concentração final na microplaca 2) aos poços 4, 5 e 6 (A-H) e G10, 11 e 12;
9. Descartou-se o conteúdo dos poços 7, 8 e 9 (A-H), retirando assim o meio com os extratos cianobacterianos;
10. Nos poços anteriores e nos poços E10, 11 e 12 adicionou-se 200 µL da solução de H₂O₂ preparada em meio de cultura (0.1 mM, concentração final, microplacas 1 e 3; 1 mM, concentração final, microplaca 2);
11. As microplacas foram incubadas numa estufa a 37°C humidificada com 5% CO₂ durante 3 horas (microplacas 1 e 2) ou durante 23 horas (microplaca 3).

3.3.2. Ensaio do MTT

A viabilidade das células HEK293T após cada condição de exposição aos extratos e ao H₂O₂ foi avaliada pelo método do ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio tetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). O teste do MTT é uma ferramenta muito comum na avaliação da atividade metabólica de células vivas (viabilidade celular), através da determinação atividade metabólica das mitocôndrias (Meerloo *et al.*, 2011; Grela *et al.*, 2018). É um ensaio colorimétrico simples para quantificar a citotoxicidade através da viabilidade celular. O MTT é um sal amarelo de tetrazólio solúvel em água e as células metabolicamente ativas são capazes de o converter em formazano azul-escuro insolúvel em água (Bruggisser *et al.*, 2002). Esta conversão pode ser quantificada espectrofotometricamente. Sob condições adequadamente otimizadas, o valor de absorvância obtido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Grela *et al.*, 2018).

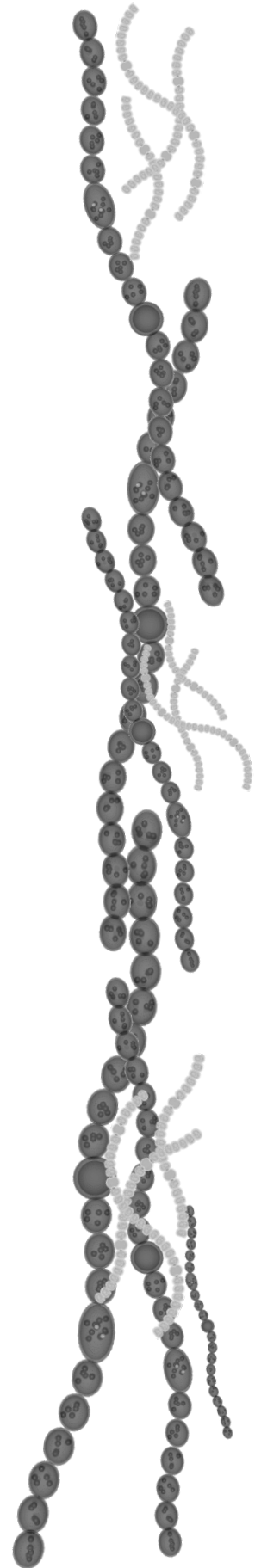
Para tal, o meio de exposição de cada poço das microplacas foi descartado e adicionou-se 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Merck, Darmstadt, Alemanha). As microplacas foram incubadas numa estufa a 37°C humidificada com 5% CO₂ durante 3 horas. Após a incubação descartou-se a solução de MTT de cada poço e adicionou-se 100 µL de uma solução de HCl 0,04 M em propanol (*Hydrochloric acid fuming 37% for analysis EMSURE® ACS, ISO e 2-Propanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®*, Merck, Darmstadt, Alemanha). Após homogeneização vigorosa num agitador de placas (ao abrigo da luz) durante 15 minutos, procedeu-

se à leitura e registo da absorvância a 570 nm no espectrofotómetro de microplacas (*Multiskan Ascent*, *Thermo Labsystems*, Helsínquia, Finlândia).

Para cada condição de exposição foi determinada a viabilidade das células HEK293T (expressa como % de Abs_{570nm} em relação ao controlo do meio de exposição dos extratos, considerando que a Abs_{570nm} dos controlos corresponde a uma viabilidade 100%). Foi também calculada a taxa de sobrevivência das células, através da razão entre o valor da viabilidade das células pré-tratadas com os extratos e posteriormente expostas a H₂O₂ relativamente às células apenas expostas a H₂O₂.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do software *IBM SPSS Statistics* (versão 24.0). Os dados cumprem a distribuição normal. Foi aplicado o teste *t-student* e as diferenças entre resultados foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4. Resultados



4.1 Caracterização morfométrica de cianobactérias e curvas de crescimento

Todas as estirpes estudadas apresentaram as características descritas para a respetiva ordem, designadamente Chroococcales [*Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127)], Nostocales [*Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088); *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009); *Nostoc* sp. (LMECYA 291)] e Oscillatoriales [*Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173); *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257); *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224)]. A exceção foi a estirpe LMECYA 180, cujas células se apresentaram isoladas, ao invés de estarem na forma filamentosa, como é típico da ordem Nostocales (Komárek, 2013).

Na tabela 4.1 estão representadas as principais características morfométricas observadas nas estirpes estudadas. Estas características estão de acordo com os aspetos morfológicos descritos para estas espécies (Komárek & Konstantinos, 2005, 2008; Komárek, 2013).

Tabela 4.1 – Características morfométricas observadas nas estirpes estudadas.

Estirpe	Forma celular	Dimensão celular (µm)(largura/comprimento)	Vesículas gasosas	Morfologia da célula terminal do filamento	Bainha de mucilagem
<i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009)	Retangular	1,87/4,62	Presentes	Cilíndrica e afunilada	Fina
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088)	Cilíndrica	2,48/5,38	Presentes	Cilíndrica e afunilada	Muito fina
<i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127)	Esférica	Diâmetro = 3,49	Inconspícuas	Não se aplica	Fina
<i>Leptolyngbya</i> sp. (LMECYA 173)	Cilíndrica	1,14/1,45	Ausentes	Cilíndrica	Fina
<i>Anabaena flos-aquae</i> (LMECYA 180)	Esférica	Diâmetro = 2,68	Inconspícuas	Não se aplica	Fina
<i>Planktothrix agardhii</i> (LMECYA 257)	Retangular	2,86/1,91	Presentes	Esférica	Ausente
<i>Nostoc</i> sp. (LMECYA 291)	Esférica	Diâmetro = 4,13	Inconspícuas	Esférica	Espessa
<i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224)	Retangular	5,30/1,65	Presentes	Arredondada	Fina

A figura 4.1 exibe algumas das características morfológicas que se observaram nas estirpes examinadas.

As curvas de crescimento das estirpes, traçadas com base na concentração celular e na absorvância a 450 nm, estão representadas nas figuras 4.2 e 4.3, respetivamente. Nem sempre foi possível observar as fases típicas do crescimento microbiano (fase de adaptação, fase exponencial, fase estacionária e fase de senescência). No entanto, estas fases estão relativamente bem definidas nalgumas estirpes (por exemplo, figura 4.2 e-j; figura 4.3 c-f).

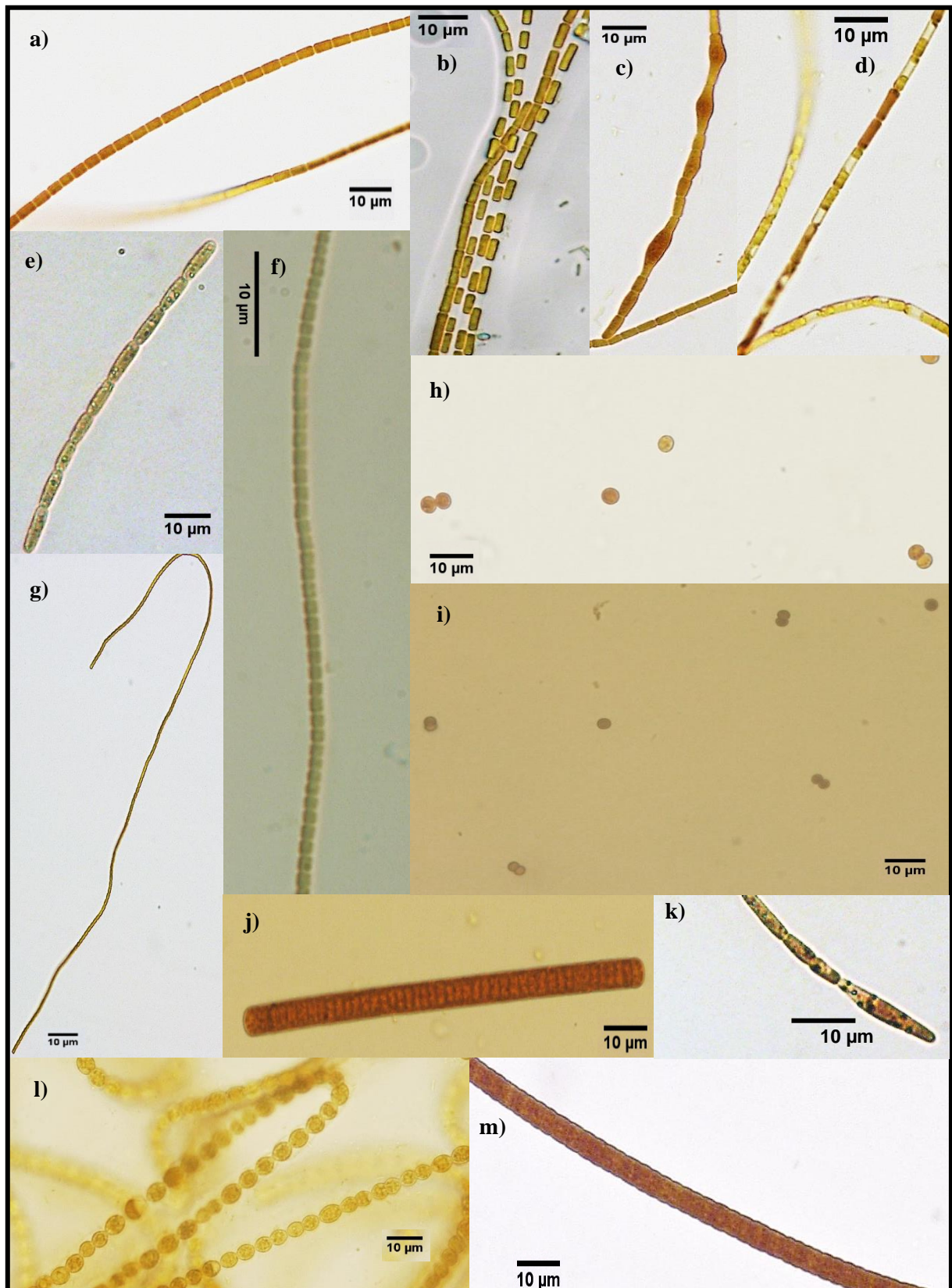


Figura 4.1. – Características morfológicas das estirpes estudadas neste trabalho. Células vegetativas de *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) normais (a) e deformadas ((b), (c) e (d)) em ampliação de 400x; Células vegetativas de *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) (e) com célula terminal do filamento (k) em ampliação de 400x; Filamento com células vegetativas de *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173) em ampliação de 400x (g) e 1000x (f); Células de *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127) (h) em ampliação de 400x; Células de *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) (i) em ampliação de 400x; Filamento de *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (j) em ampliação de 400x; Células vegetativas de *Nostoc* sp. (LMECYA 291) (l) em ampliação de 400x; *Planktothrix agardhii* (m) em ampliação de 400x.

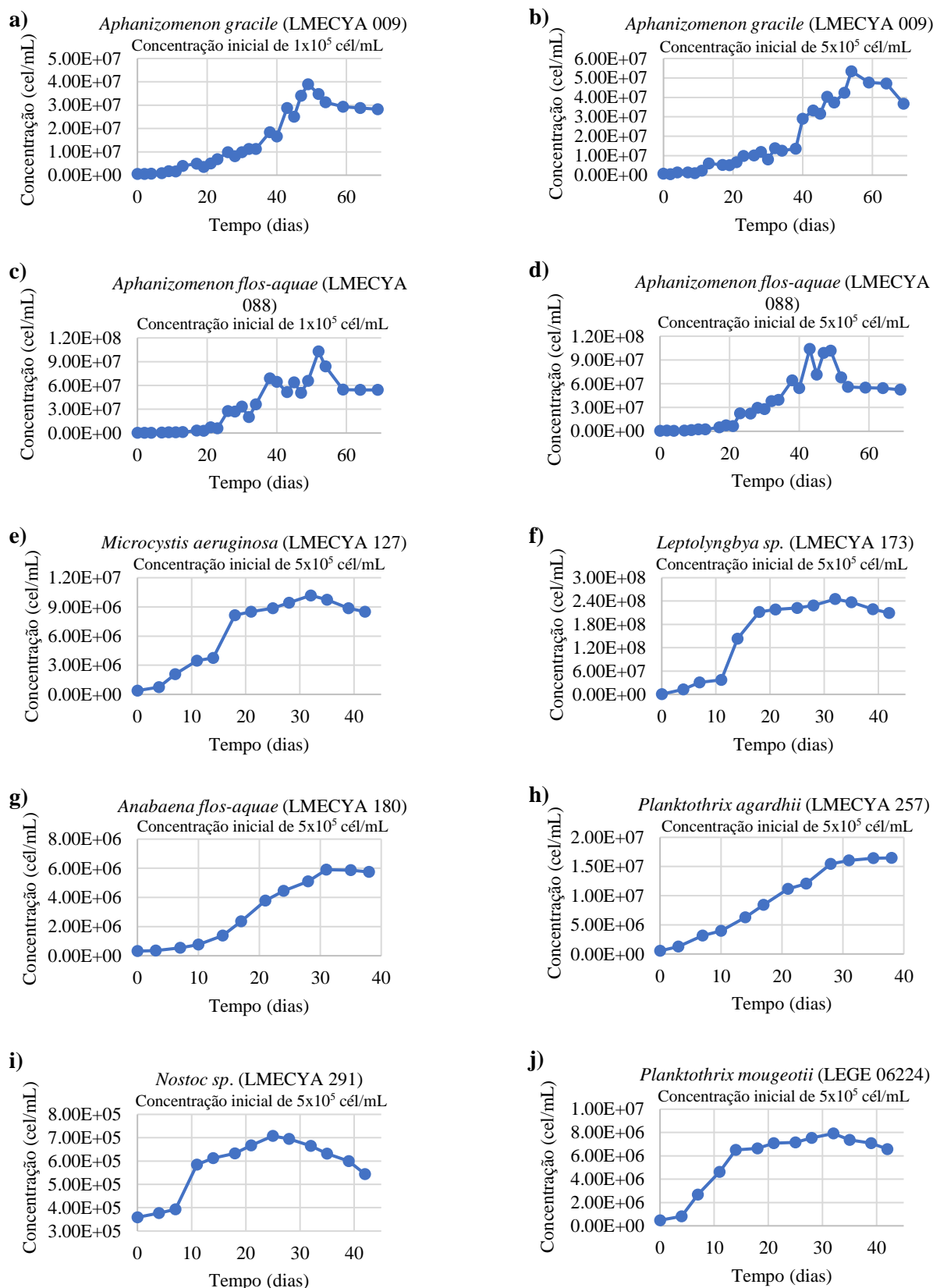


Figura 4.2. – Curvas de crescimento (concentração celular vs tempo) de culturas com concentração celular inicial de 1×10^5 cél/mL: **a)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e **c)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e concentração inicial de 5×10^5 cél/mL: **b)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), **d)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), **e)** *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), **f)** *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), **g)** *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), **h)** *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), **i)** *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e **j)** *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).

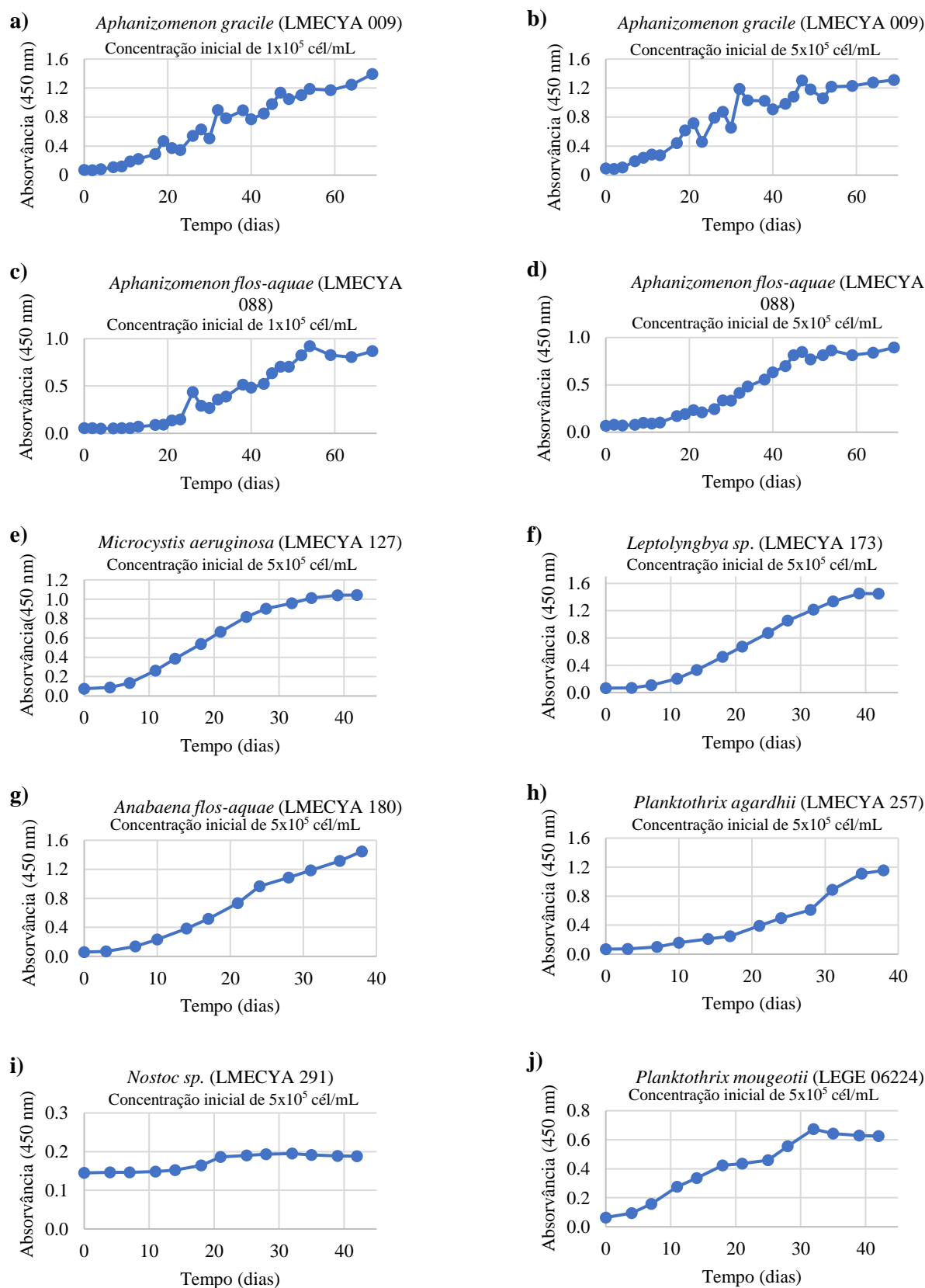


Figura 4.3. - Curvas de crescimento (absorv  ncia vs tempo) de culturas com concentra  o inicial de 1×10^5 c  l/mL: **a)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e **c)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e concentra  o inicial de 5×10^5 c  l/mL: **b)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), **d)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), **e)** *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), **f)** *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), **g)** *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), **h)** *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), **i)** *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e **j)** *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).

Através dos dados das curvas de crescimento, foi possível calcular a taxa de crescimento, o tempo de duplicação e a concentração celular máxima obtida por cada uma das 8 estirpes (Tabela 4.2). Como se pode observar nesta tabela, as taxas de crescimento não diferiram muito entre as estirpes e foram, aproximadamente 0.1 divisões /dia, exceto as estirpes *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Nostoc* sp. (LMECYA 291), que apresentaram taxas de crescimento de cerca de 60% e 10% desse valor, respetivamente. Como também se pode constatar, não se observou uma relação proporcional entre a taxa de crescimento e a concentração celular máxima.

4.2 Produção, recolha e extração de biomassa de cianobactérias

As estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173) e *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) (Figura 4.4a, b, c, d, e, respetivamente) cresceram de forma relativamente semelhante nos balões, com uma distribuição homogénea pelo meio de cultura. As estirpes *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (Figura 4.4g), apesar da agitação do meio induzida pela injeção de ar, tiveram tendência a fixar-se no fundo e nas paredes dos balões e a estirpe *Nostoc* sp. (LMECYA 291), de se depositar (sem aderir) no fundo do balão (Figura 4.4f).

Durante o processo de decantação da biomassa, nas estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Nostoc* sp. (LMECYA 291) houve boa separação entre a biomassa e o meio de cultura, estando a biomassa depositada na parte inferior da ampola de decantação (Figura 4.5a, b, c respetivamente). A biomassa das estirpes *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) depositou-se na base da ampola de decantação e também se acumulou na superfície do meio de cultura, formando uma camada de biomassa com, aproximadamente, 1,5 cm de espessura, como no caso da estirpe LMECYA 257, ou aglomerados de biomassa flutuante com aproximadamente 3,5 cm de espessura, como no caso da estirpe LEGE 06224 (Figura 4.5d, e).

A biomassa decantada foi centrifugada de forma a obter-se *pellets* celulares concentrados. A biomassa das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173) e *Anabaena flos aquae* (LMECYA 180) acumulou-se no fundo do frasco, separando-se do meio líquido, mas não se agregou o suficiente tendo de ser “aspirada” de forma a impedir a sua ressuspensão no meio. A biomassa das estirpes *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc* sp. (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) condensou-se no fundo do frasco e originou um *pellet* suficientemente compacto de forma a ser removido com um raspador/espátula (Figura 4.6a, b, c, d). No caso das estirpes LMECYA 257 e LEGE 06224, registou-se sempre uma densidade significativa de células em suspensão.

Após a centrifugação, a biomassa foi congelada e colocada no liofilizador, até estar totalmente desidratada (Figura 4.7).

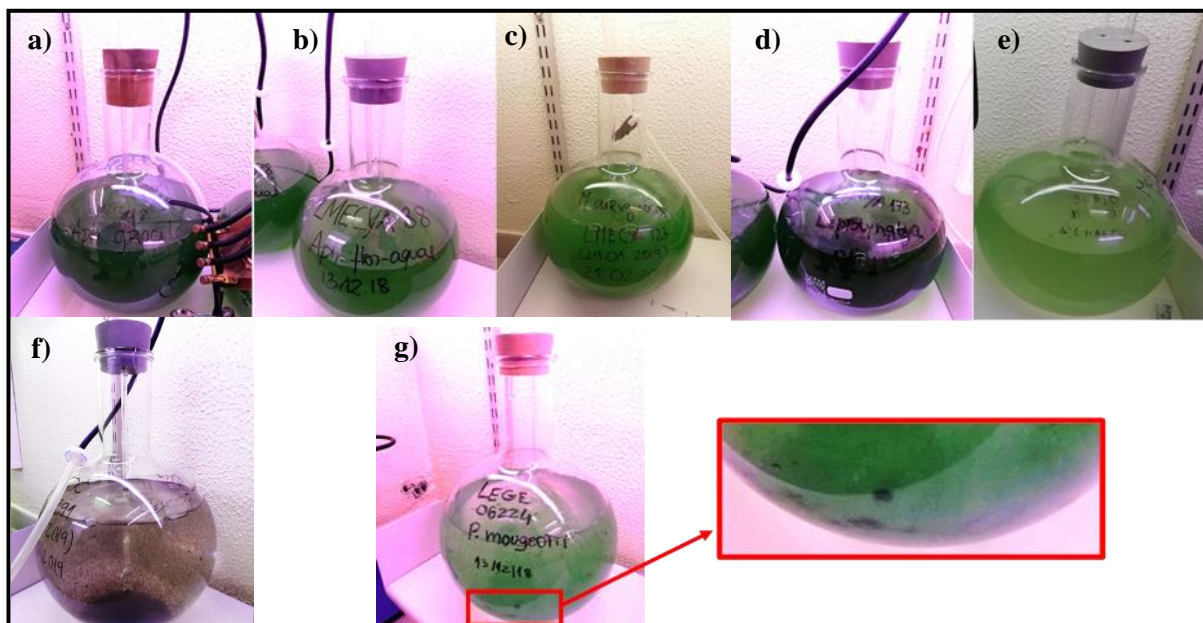


Figura 4.4. – Balões de crescimento de biomassa das estirpes de cianobactérias. **a)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), **b)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), **c)** *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), **d)** *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), **e)** *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), **f)** *Nostoc* sp. (LMECYA 291) e **g)** *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) com o pormenor da fixação na base do balão.

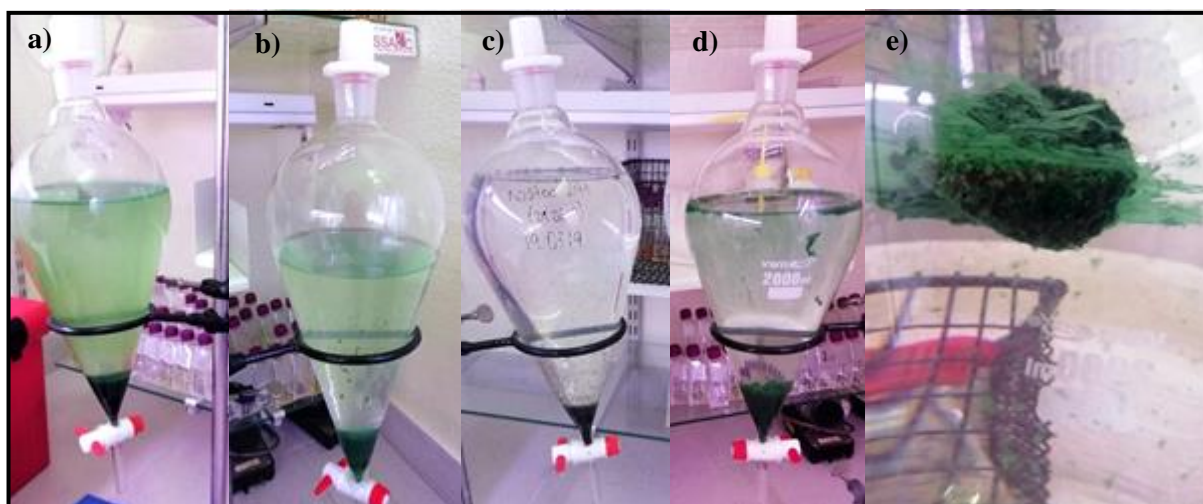


Figura 4.5. – Ampolas de decantação da biomassa das cianobactérias. **a)** *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), **b)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) **c)** *Nostoc* sp. (LMECYA 291), **d)** *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), **e)** aglomerado flutuante de biomassa de *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).

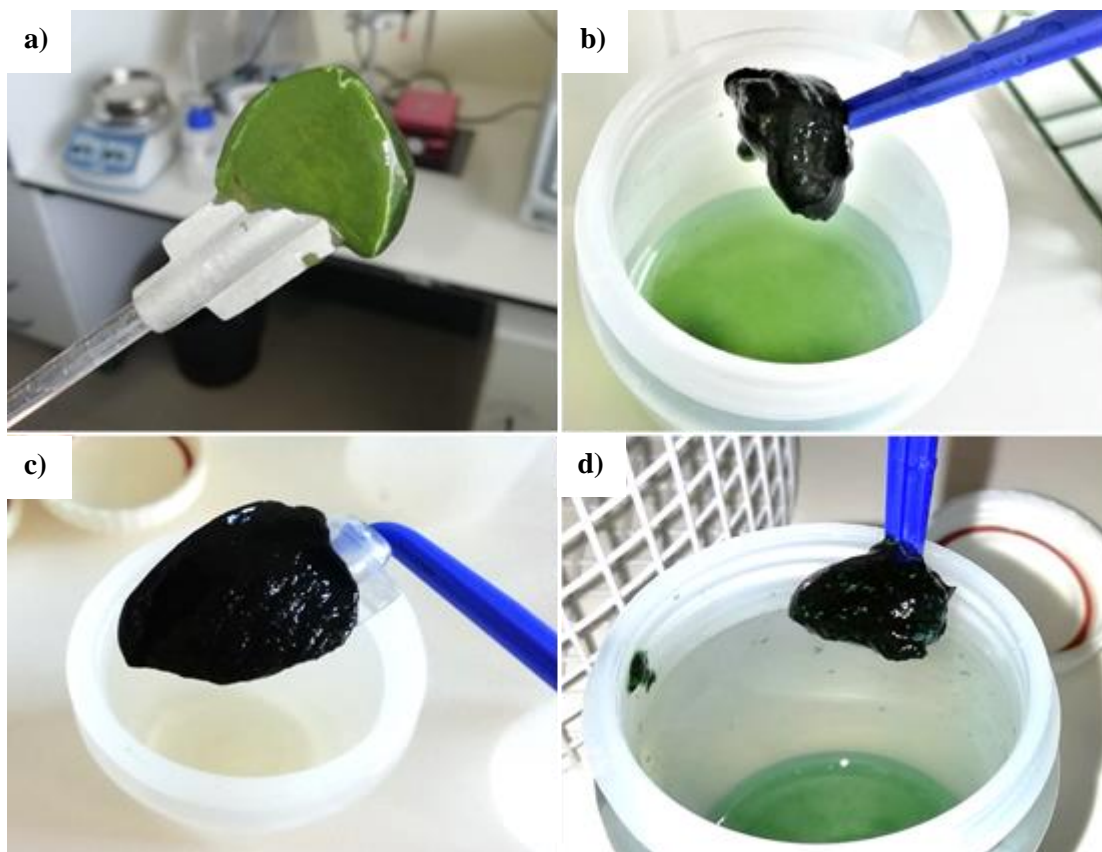


Figura 4.6. – Pellets formados pela biomassa das estirpes de cianobactérias após centrifugação. **a)** *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), **b)** *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), **c)** *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e **d)** *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224).



Figura 4.7. - Amostra da estirpe *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) após congelamento (á esquerda) e depois da liofilização (á direita).

Após a liofilização, a biomassa de todas as estirpes foi pesada e determinou-se o rendimento de cada uma em função do peso obtido e do volume inicial de cultura (5L) (Tabela 4.2).

Com a pesagem do resíduo seco resultante do processo de extração de biomassa, calculou-se o rendimento da mesma em função do peso de biomassa liofilizada (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 - Taxa de crescimento, tempo de duplicação, concentração celular máxima e rendimento da produção de biomassa das estirpes de cianobactérias.

Estirpe	Taxa de Crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	Tempo de Duplicação (dias)	Concentração celular máxima (cél/mL)	Rendimento (g/L)
<i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009)	0.084 \pm 0.004	8.3 \pm 0.4	5,35x10 ⁷	27,18 x 10 ⁻³
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088)	0.063 \pm 0.002	11.1 \pm 0.4	1,04x10 ⁸	29,78 x 10 ⁻³
<i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127)	0.098 \pm 0.001	7.09 \pm 0.04	1,02x10 ⁷	25,06 x 10 ⁻³
<i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173)	0.1026 \pm 0.0003	6.76 \pm 0.02	2,45x10 ⁸	17,19 x 10 ⁻³
<i>Anabaena flos-aquae</i> (LMECYA 180)	0.1130 \pm 0.0005	6.14 \pm 0.03	5,90x10 ⁶	22,28 x 10 ⁻³
<i>Planktothrix agardhii</i> (LMECYA 257)	0.084 \pm 0.010	8 \pm 1	1,65x10 ⁷	22,26 x 10 ⁻³
<i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291)	0.015 \pm 0.002	45 \pm 5	7,08x10 ⁵	21,98 x 10 ⁻³
<i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224)	0.109 \pm 0.005	6.4 \pm 0.3	7,91x10 ⁶	25,44 x 10 ⁻³

Tabela 4.3 – Rendimento (%) (p/p), das extrações de cianobactérias com os diferentes solventes.

Estirpe	Rendimento (%)	
	Etanol	Metanol
<i>Aphanizomenon gracile</i> (LMECYA 009)	9,62	17,42
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (LMECYA 088)	5,64	19,21
<i>Microcystis aeruginosa</i> (LMECYA 127)	5,62	15,83
<i>Leptolyngbya sp.</i> (LMECYA 173)	5,61	18,72 e 22,08
<i>Anabaena flos-aquae</i> (LMECYA 180)	8,72	18,36
<i>Planktothrix agardhii</i> (LMECYA 257)	4,65	13,30
<i>Nostoc sp.</i> (LMECYA 291)	4,93	16,89
<i>Planktothrix mougeotii</i> (LEGE 06224)	3,38	13,15

NOTA: a estirpe *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) apresenta 2 valores de rendimento nas extrações com o mesmo solvente, pois foi extraída duas vezes em fases diferentes devido à escassez de extrato.

4.3 Ensaios para a determinação da atividade antioxidante

Para os ensaios de antioxidantes foram calculadas as retas de calibração presentes na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Retas de calibração calculadas para os diferentes ensaios para a determinação da atividade antioxidante.

Reta para o ensaio	Equação da reta	R ²
DPPH	y = 0.5439x - 0.5861	0,9999
Compostos fenólicos	y = 6,351x - 0,112	0,9992
Flavonóides	y = 0,8561x + 0,0304	0,9971

Os resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH estão representados na figura 4.8.

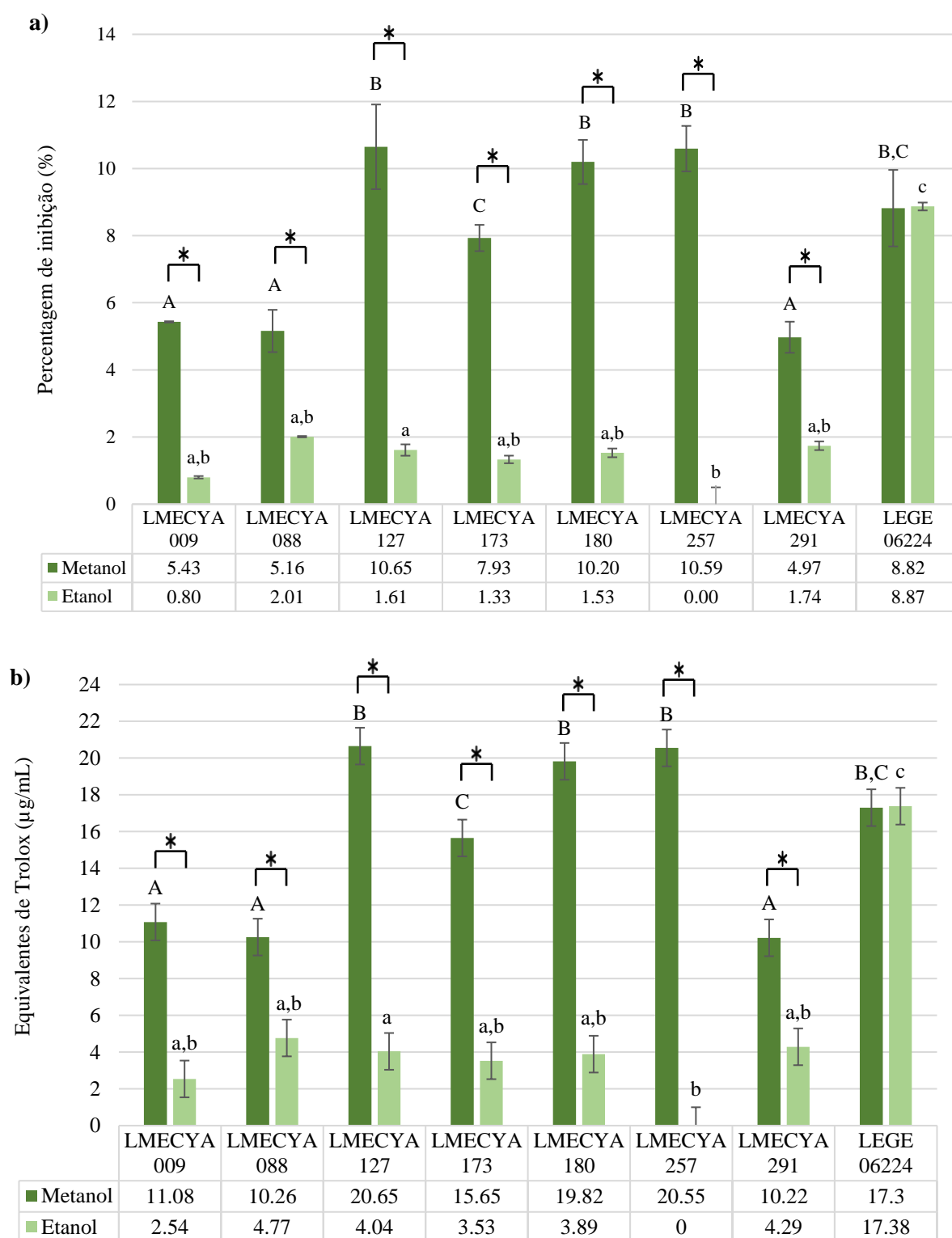


Figura 4.8 – Gráfico da percentagem de inibição **(a)** e Equivalentes de Trolox (µg/mL) **(b)** dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc* sp. (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224). A, B, C – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos; a, b, c – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos etanólicos; * - diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos e etanólicos; $p < 0,05$.

Verificou-se que o metanol foi o solvente com o qual se obtiveram os valores mais elevados de percentagem de inibição (Figura 4.8a) e equivalentes de Trolox (ET $\mu\text{g/mL}$) (Figura 4.8b) em todas as estirpes com a exceção da estirpe de *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), em que os valores obtidos foram semelhantes em ambos os extratos. Nos extratos metanólicos, as estirpes com percentagens de inibição mais elevadas, foram *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) e *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257).

No ensaio da determinação do conteúdo total em compostos fenólicos, os resultados mais elevados, na maioria das estirpes, foram obtidos nos extratos etanólicos (Figura 4.9). A estirpe *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) foi a que obteve o melhor resultado com um valor de 123,2 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato, seguida da estirpe *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), com um resultado de 102,32 mg EAG/g de extrato. Com o extrato metanólico, as estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127) foram as que obtiveram os resultados mais elevados (68,07 e 67,07 mg EAG/g de extrato, respetivamente). As restantes estirpes tiveram resultados relativamente semelhantes com os dois solventes, com exceção do *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), que apesar de ter tido melhores resultados com o etanol, estes foram inferiores aos obtidos com os extratos etanólicos das estirpes de *Aphanizomenon*.

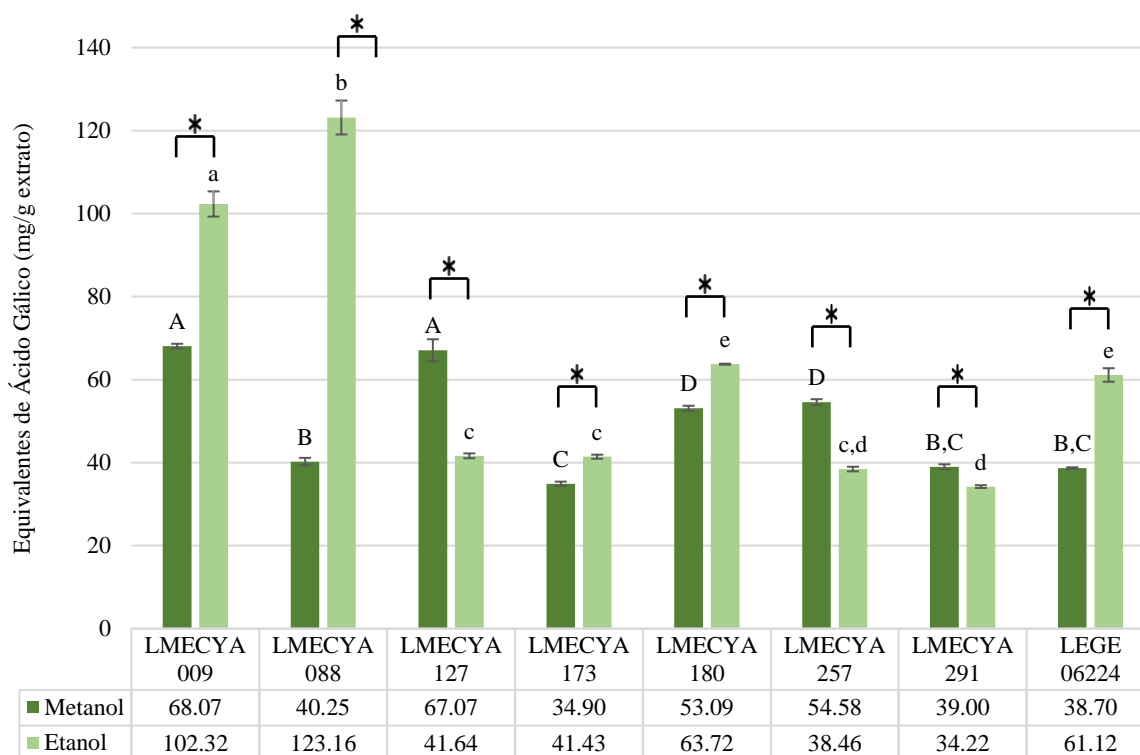


Figura 4.9 - Gráfico da determinação do conteúdo total em compostos fenólicos em Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g de extrato) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL de todas as estirpes: *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224). A, B, C, D – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos; a, b, c, d, e – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos etanólicos; * – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos e etanólicos; $p < 0,05$.

No ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides, os resultados foram mais elevados nos extratos etanólicos, para as estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) [606 e 901 mg EQR/g de extrato, respetivamente], em relação às outras estirpes em ambos os extratos etanólicos e metanólicos (Figura 4.10). As restantes estirpes exibiram resultados

relativamente semelhantes entre os extratos com os dois solventes, apesar de, na maioria das estirpes, terem sido superiores nos extratos metanólicos. A estirpe *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) foi a que apresentou a maior diferença entre os EQR dos dois extratos para além das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088).

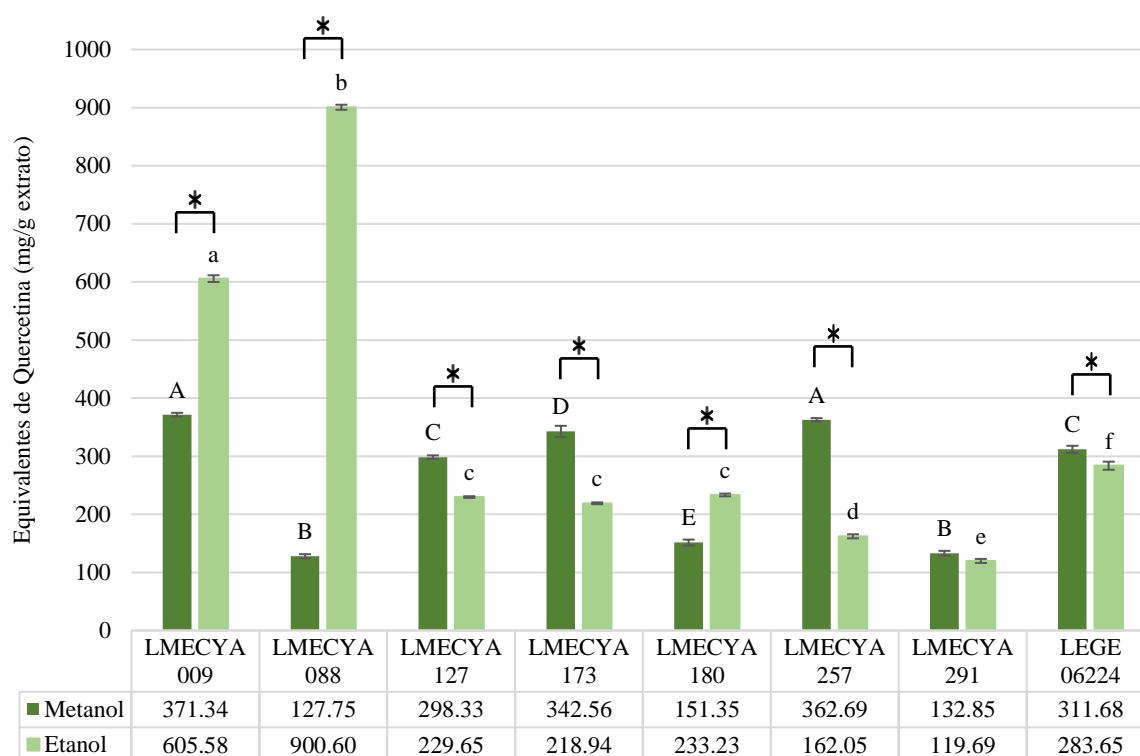


Figura 4.10 - Gráfico da determinação do conteúdo total em flavonóides em Equivalentes de Quercetina (mg/g de extrato) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL de todas as estirpes: *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc* sp. (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224). A, B, C, D, E – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos; a, b, c, d, e, f – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos etanólicos; * - diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos e etanólicos; $p < 0,05$.

Os resultados referentes ao ensaio do branqueamento do β -caroteno estão representados na figura 4.11. De uma forma geral, a extração etanólica produziu melhores resultados na maioria das estirpes e a *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) obtiveram os valores mais elevados (825,94 e 690,47 ACC), seguidas da estirpe *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) com 383,97 ACC. No caso dos extratos metanólicos, a estirpe *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127) apresentou o valor mais elevado (456,19 AAC), que foi consideravelmente superior ao do extrato etanólico, também observado no ensaio do sistema de inibição do DPPH. Nas restantes estirpes, as diferenças entre os solventes não foram tão acentuadas.

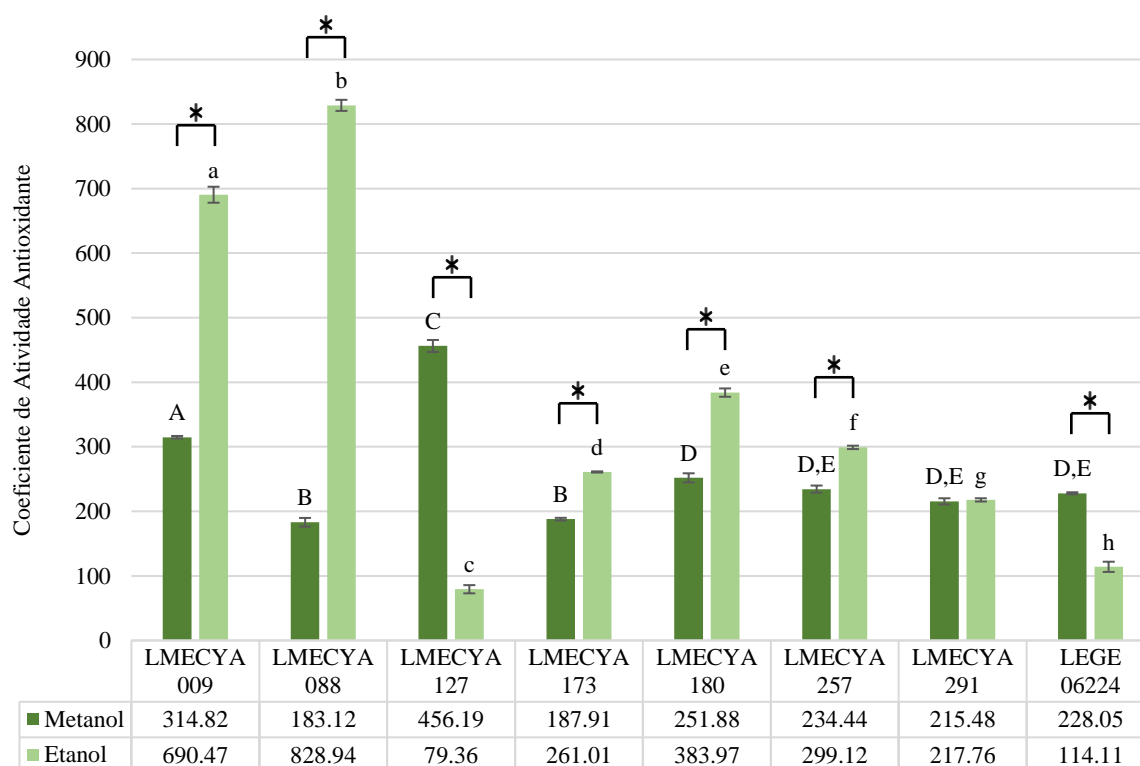


Figura 4.11 - Gráfico do Coeficiente de Atividade Antioxidante (AAC) dos extratos cianobacterianos com concentração de 1 mg/mL de todas as estirpes: *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224). A, B, C, D, E – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos; a, b, c, d, e, f, g, h – diferenças estatisticamente significativas entre os extratos etanólicos; * - diferenças estatisticamente significativas entre os extratos metanólicos e etanólicos; $p < 0,05$.

4.4 Efeito protetor de extratos de cianobactérias na linha celular HEK293T contra a citotoxicidade induzida por H₂O₂

Os resultados relativos à viabilidade celular de uma curta exposição (1h) a extratos etanólicos (1 mg/mL) de cianobactérias e uma longa exposição (23h) a H₂O₂ (0,1 mM) estão representados na figura 4.12a. Na maioria das estirpes não se observaram diferenças significativas entre a viabilidade das células expostas aos extratos etanólicos de cianobactérias e H₂O₂ (independentemente da realização ou não da lavagem prévia à adição de H₂O₂) e das células expostas apenas aos extratos. Desta forma, os extratos parecem reverter ou evitar o efeito citotóxico do H₂O₂. A exceção foi o caso das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), em que a viabilidade das células expostas aos extratos e a H₂O₂ com lavagem (barras roxas da figura 4.12a) foi significativamente menor que a viabilidade das células nas outras condições de exposição (barras vermelhas e verdes da figura 4.12a). Contudo, a viabilidade celular foi sempre mais elevada nas células pré-tratadas com os extratos etanólicos de cianobactérias comparativamente ao controlo positivo (células expostas apenas a H₂O₂). Aliás, os extratos de todas as estirpes induziram a sobrevivência celular com uma percentagem de sobrevivência que variou entre 7 e 53% (Figura 4.12b).

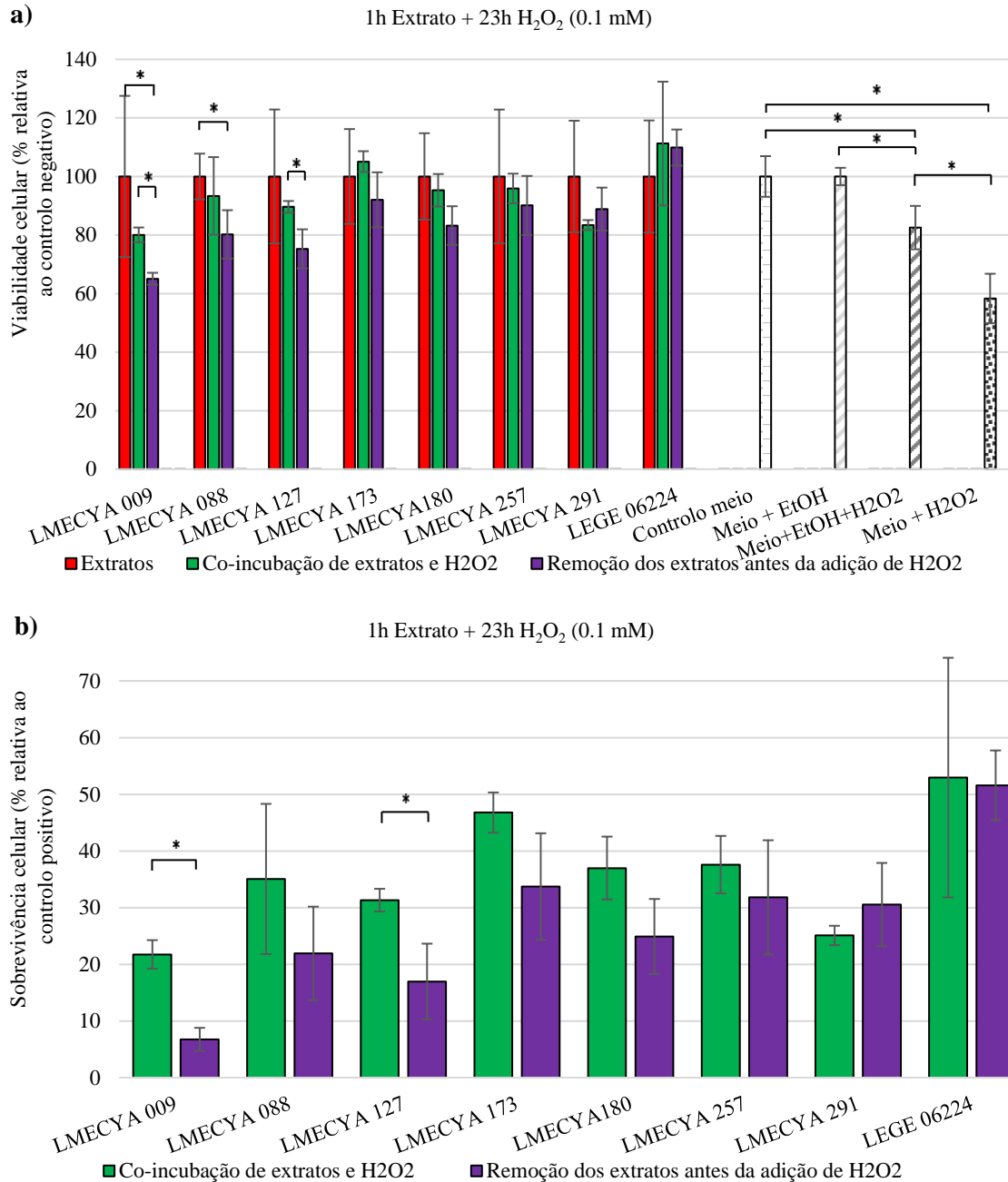


Figura 4.12 – Viabilidade (a) e sobrevivência (b) das células submetidas a uma curta exposição (1h) aos extratos etanólicos (1 mg/mL) cianobacterianos (*Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224)) e longa exposição (23h) a H₂O₂ (0.1 mM) (* indica uma diferença estatística significativa relativamente ao controlo, $p < 0,05$).

Nas células submetidas a uma exposição longa (23h) aos extratos etanólicos e a uma curta exposição (3h) a uma concentração 10x maior de H₂O₂ (1mM) os resultados diferiram dos anteriores.

A viabilidade das células previamente tratadas com os extratos (com e sem a lavagem) foi significativamente menor que a das células apenas expostas aos extratos. A viabilidade diminuiu entre 43 e 65% (Figura 4.13a) após a exposição a H₂O₂, quando comparada à viabilidade das células expostas apenas aos extratos etanólicos de cianobactérias. No entanto, os extratos conferiram alguma proteção contra o H₂O₂. Na generalidade, a sobrevivência celular (Figura 4.13b) variou entre 8 e 30%, e não se

observou diferenças significativas entre os resultados das células com co-incubação de extratos e H₂O₂ e com a etapa de lavagem dos extratos de cianobactérias antes da exposição a H₂O₂.

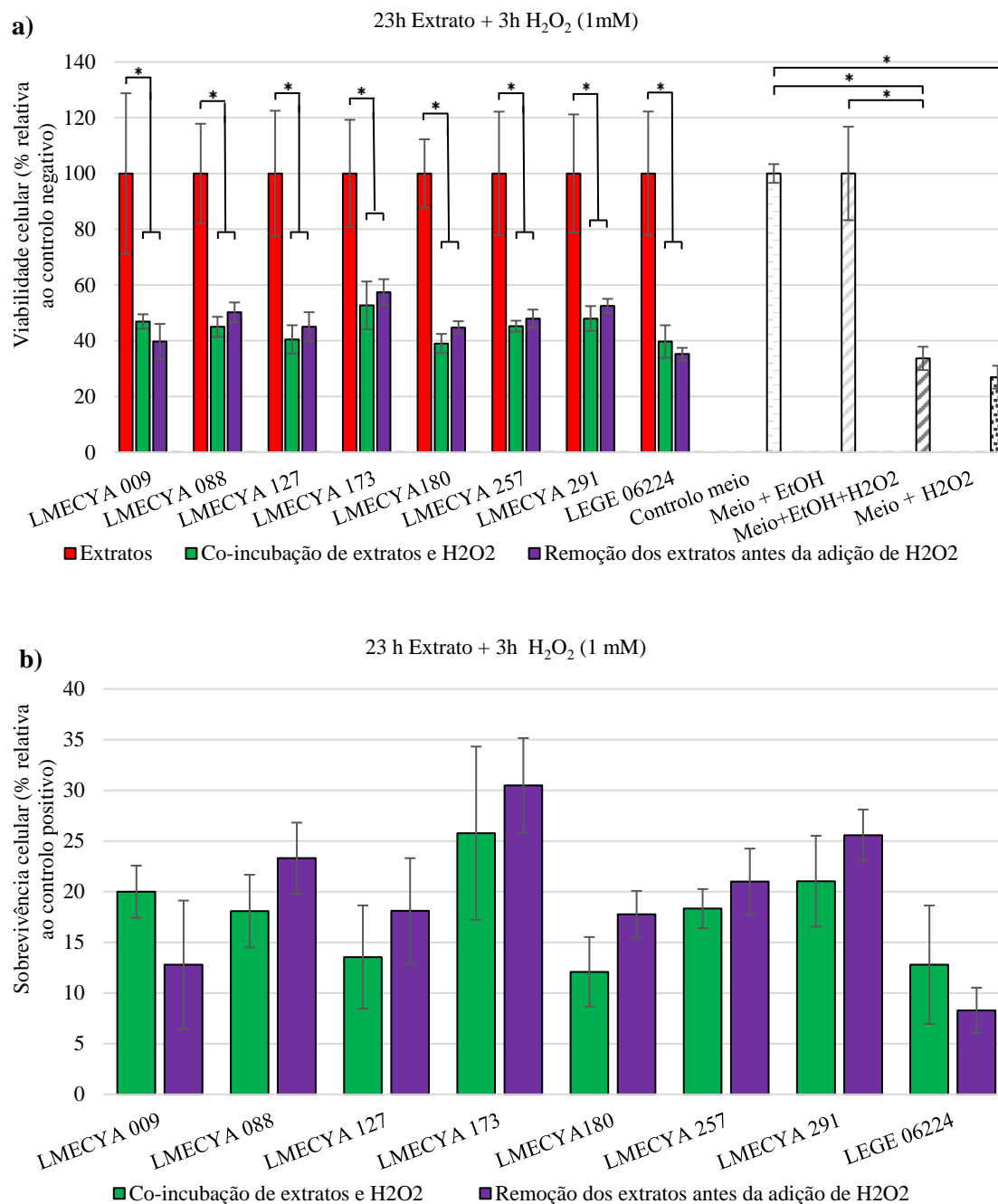
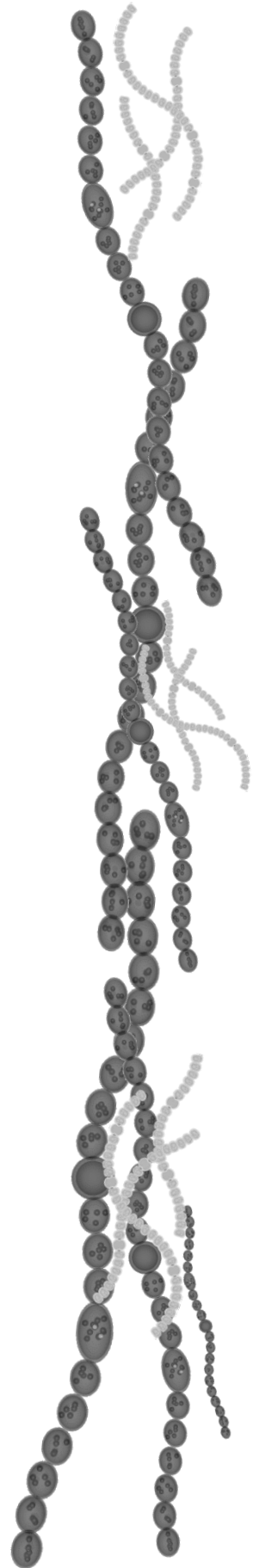


Figura 4.13 – Viabilidade (a) e sobrevivência (b) das células submetidas a uma longa exposição (23h) aos extratos etanólicos (1 mg/mL) cianobacterianos (*Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224)) e curta exposição (3h) a H₂O₂ (1 mM) (* indica uma diferença estatística significativa relativamente ao controlo, $p < 0,05$).

Curiosamente, a maioria dos extratos etanólicos de cianobactérias levou à sobrevivência de mais de 25% das células no ensaio de curta exposição aos extratos e longa exposição ao H₂O₂. Os extratos das estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) foram os que se mostraram mais eficazes. No ensaio de exposição longa a extratos e curta a H₂O₂ as estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) foram as únicas que mostraram uma sobrevivência superior a 25%.

Não foi possível tirar conclusões acerca do efeito protetor dos extratos no ensaio de curta exposição aos extratos (1h) e curta exposição a H_2O_2 (3h) porque os controlos positivos do ensaio não diferiram significativamente dos controlos negativos. Ou seja, o peróxido de hidrogénio não exerceu atividade citotóxica nas condições de exposição testadas (0.1 mM/3h). Como tal, os dados referentes a esta exposição não foram incluídos.

5. Discussão



O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de estirpes de cianobactérias isoladas de ambientes hídricos. Foram estudadas oito estirpes, sete das quais isoladas de reservatórios de água doce superficial e uma isolada de uma ETAR. As estirpes pertencem às coleções de culturas de algas “Estela Sousa e Silva”- ESSACC (cuja referência é LMECYA) e “*Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection*” – LEGE-CC (cuja referência é LEGE). O estudo foi realizado a dois níveis distintos. Por um lado, determinou-se o perfil antioxidante de extratos etanólicos e metanólicos das estirpes cianobacterianas através de métodos químicos, designadamente através da análise do seu conteúdo em compostos com atividade antioxidante (compostos fenólicos e flavonóides) e da sua atividade antioxidante (inibição do radical DPPH e branqueamento do β -caroteno). Por outro lado, utilizou-se um método biológico (determinação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT) para avaliar o efeito protetor dos extratos cianobacterianos (etanólicos) contra a ação do peróxido de hidrogénio numa linha celular humana (HEK293T).

5.1 Caraterização das estirpes e produção de biomassa

Previamente à produção de biomassa para posterior extração e avaliação do perfil antioxidante, caraterizou-se a morfologia e o crescimento das estirpes de cianobactérias, de forma a caraterizar o seu crescimento *in vitro*. O conhecimento acerca da forma como as estirpes crescem e de que forma se adaptam às condições de cultura é importante, uma vez que o rendimento da produção de biomassa, e a sua qualidade, são aspetos fundamentais nos processos biotecnológicos.

Tal como referido na secção dos resultados, as células das estirpes estudadas apresentaram a morfologia e dimensões caraterísticas das respetivas espécies (Rajaniemi *et al.*, 2005; Komárek, 2007; Galhano *et al.*, 2011; Karlson *et al.*, 2018; Guiry & Guiry, 2019). A exceção foi a estirpe *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) que em habitat natural forma colónias filamentosas com tricomas uniformes e com células cilíndricas ou arredondadas, apresentando heterocistos e acinetos (Prasanna *et al.*, 2006). No entanto, a estirpe LMECYA 180 apresentou células esféricas individuais ou em pares e não foram observados heterocistos e acinetos. Estas alterações podem dever-se ao facto de a estirpe ser mantida em condições de laboratório ótimas para o seu crescimento, sem a pressão de fatores de *stress* ambiental (Galhano *et al.*, 2011). De facto, as condições de cultura poderão ser otimizadas de forma a proporcionar as melhores condições de crescimento, o que no caso das cianobactérias não implica soluções técnicas muito complicadas e dispendiosas (Morone *et al.*, 2019).

As estirpes estudadas apresentam morfologias muito diferentes entre si e particularidades que podem interferir com a quantificação celular e com a produtividade da biomassa produzida. A estirpe *Nostoc sp.* (LMECYA 291), por exemplo, apresenta tricomas no interior de esferas gelatinosas, o que requer um passo de sonicação prévio à contagem celular de forma a libertar os tricomas e individualizar as células para facilitar a contagem. As estirpes de *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), durante o crescimento da biomassa, depositam-se no fundo dos balões, apesar da circulação de ar no meio de cultura, o que pode ser explicado pelo facto da velocidade da circulação de ar exceder a velocidade de flutuação das estirpes e de estas aumentarem de densidade (Walsby, 1994; Visser *et al.*, 2016). Por outro lado, é sabido que em meio natural, a espécie *Planktothrix rubescens* pode concentrar-se na coluna de água a determinadas profundidades. Isto deve-se à sua capacidade em regular a sua flutuação e o mesmo pode acontecer em laboratório, o que poderá dificultar a recolha da biomassa (Walsby *et al.*, 2006).

As diferenças ocorridas entre as estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Nostoc sp.* (LMECYA 291), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) relativamente à decantação e concentração da biomassa podem ser explicadas pela presença ou ausência de vesículas gasosas e pela densidade das células (Walsby, 1994). As estirpes de *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA

088) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) podem não apresentar, ou apresentar baixo conteúdo em vesículas gasosas e/ou um aumento da densidade das células, o que provoca a deposição das mesmas na base da ampola de decantação (Dinsdale & Walsby, 1972). No caso das estirpes de *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) a acumulação de células tanto no topo como na base das ampolas de decantação pode também ser explicada pelos fundamentos anteriores. As células que se acumularam à superfície podem apresentar maior número ou dimensão de vesículas gasosas, em conjunto com uma menor densidade das células. As células que se depositaram na base podem apresentar menor número ou dimensão das vesículas gasosas e/ou uma maior densidade celular (Camacho *et al.*, 2000). As restantes estirpes, *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), permaneceram homoganeamente distribuídas no meio de cultura, devido à velocidade da circulação de oxigénio não exceder significativamente a velocidade de flutuação das células (Visser *et al.*, 2016).

Na maioria das estirpes, a concentração por centrifugação foi eficaz uma vez que a força da centrifugação foi suficiente para induzir a deposição das células e a obtenção de *pellets* celulares. No entanto, a eficácia da centrifugação foi menor no caso das estirpes *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) uma vez que, apesar de as células se terem depositado, na grande maioria, no fundo do frasco, uma fração significativa de células permaneceu em suspensão, o que diminuiu o rendimento da recolha de biomassa. De referir que as vesículas gasosas possuem diferentes pressões de rutura, influenciadas pela sua dimensão, morfologia e espessura (Abeynayaka *et al.*, 2017).

Para além dos aspetos morfológicos, também o crescimento específico das estirpes influencia o rendimento da produção de biomassa. De uma forma geral, as estirpes cianobacterianas atingiram a fase estacionária em cerca de 30 dias, o que está de acordo com o período de tempo descrito para as cianobactérias atingirem o pico de crescimento (Wong & Brown, 2012). As estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) foram exceção, pois atingiram a densidade celular máxima aos 60 dias, tal como descrito previamente para *Aphanizomenon issastchenkoii* (Dias *et al.*, 2002). As estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) apresentaram as taxas de crescimento mais elevadas, da ordem de $0,1 \mu\text{m dia}^{-1}$, o que está de acordo com os valores previamente descritos para cianobactérias (Giannuzzi, 2018). Consequentemente, estas estirpes apresentaram o menor tempo de duplicação, na ordem de 6.1-6.8 dias. A estirpe *Nostoc sp.* (LMECYA 291) apresentou uma taxa de crescimento cerca de 10 vezes inferior às outras estirpes e um tempo de duplicação bastante mais elevado (45 dias). Este facto poderá ser explicado devido às características da sua morfologia, nomeadamente a presença de colónias esféricas gelatinosas que constituem agregados de filamentos, e que dificultam a leitura espectrofotométrica.

No entanto, saliente-se que nem sempre o maior rendimento da produção e recolha de biomassa, relacionado com o seu peso seco, corresponde à maior taxa de crescimento das cianobactérias. Por exemplo, a estirpe *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) foi a que obteve o maior rendimento de biomassa ($29,78 \times 10^{-3}$) e a estirpe *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), o menor rendimento ($17,19 \times 10^{-3}$). Porém, a taxa de crescimento desta última ($0,1026 \pm 0,0003 \text{ dia}^{-1}$) é superior à daquela ($0,063 \pm 0,002 \text{ dia}^{-1}$), sendo o seu tempo de duplicação 1,6 vezes inferior. No entanto, deve ter-se em conta as dimensões celulares das estirpes. De facto, as células de *Aphanizomenon flos-aquae* apresentam uma média de $5,38 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,48 \mu\text{m}$ de largura e as células de *Leptolyngbya sp.* uma média de $1,45 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,14 \mu\text{m}$ de largura. Isto significa que o volume das células de *Aphanizomenon flos-aquae* é maior do que as células de *Leptolyngbya sp.*, o que se repercute no maior rendimento na produção de biomassa de LMECYA 088. Outro exemplo interessante é a estirpe *Nostoc sp.* (LMECYA 291), cujo rendimento não diferiu significativamente das outras estirpes, não obstante ter apresentado

uma taxa de crescimento 10 vezes inferior, possivelmente devido à sua subavaliação pelos motivos referidos anteriormente.

Assim, a seleção de estirpes para fins biotecnológicos deverá ter em consideração as características morfológicas dos organismos a estudar, bem como os parâmetros que caracterizam o seu crescimento e de que forma estes se relacionam com o rendimento da produção da biomassa e compostos bioativos.

5.2 Extração de biomassa

O metanol e o etanol têm sido os solventes mais utilizados em extrações de compostos com atividade antioxidante em plantas (Sultana *et al.*, 2009). No presente trabalho, de forma geral, o melhor solvente para a extração de biomassa foi o metanol. Efetivamente, no que toca a resíduo seco de biomassa após extração, a extração realizada com metanol rendeu cerca do dobro da realizada com etanol (anidro), para cada estirpe. Embora ambos os solventes sejam compostos orgânicos polares, apresentam diferenças na sua polaridade, o que poderá justificar a diferença no rendimento da extração (Sasidharan *et al.*, 2011). Para além disso, o metanol é um composto mais corrosivo e agressivo que o etanol, causando uma maior desintegração celular, permitindo um maior rendimento (Klein *et al.*, 2012). De futuro, seria conveniente diversificar os solventes utilizados, acrescentando solventes como acetona, hexano, água destilada, acetato de etilo, clorofórmio ou mistura de mais do que um destes (Moure *et al.*, 2001; Yasin *et al.*, 2019). Uma mistura aquosa de metanol, acetona ou etanol (como por exemplo etanol a 70%) poderá até ser mais eficaz devido à diferença da polaridade da água e do solvente orgânico, o que permite a dissolução de compostos com polaridades variadas (Do *et al.*, 2013). No entanto, para aplicações alimentares dos extratos, não devem ser usados solventes que apresentem toxicidade para o ser humano, como é o caso de metanol, hexano e acetona (Parniakov *et al.*, 2014).

O processo de extração utilizado no presente trabalho poderá não ter sido o suficiente para a extração eficiente da biomassa e dos seus compostos. Na fase de extração procedeu-se, após mistura da biomassa liofilizada com o solvente, à agitação num agitador horizontal (30 minutos a 350 rpm) seguida de centrifugação (10 minutos a 3100 rpm) e recolha de sobrenadante. Para a extração ser eficiente é preciso garantir que exista a maior área de superfície de contato possível entre a biomassa e o solvente e que este se infiltre nas células (Safafar *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2010). Existem vários métodos que podem ser utilizados para garantir que isso aconteça, sendo eles:

- Campo elétrico pulsado (*Pulsed electric field* – PEF) – produz uma alteração na estrutura da membrana celular, tornando-a permeável, através de pulsos elétricos. Produz extratos de elevada qualidade e pureza e possibilita aumentar o rendimento e qualidade dos compostos extraídos (Goettel *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2014);
- Descargas elétricas de alta tensão (*High voltage electrical discharges* – HVED) – a solução aquosa de extrato sofre uma introdução direta de energia que causa alterações e processos químicos e físicos na mesma (Boussetta & Vorobiev, 2014);
- Homogeneização a alta pressão (*High pressure homogenization* – HPH) – produz diversos processos mecânicos que originam a lise celular (turbulência, *stress* e cavitação) (Shene *et al.*, 2016);
- Ultrassons – as paredes e membranas celulares são quebradas devido às ondas ultrassons (ondas mecânicas) que alteram as propriedades físicas e químicas das células facilitando a extração de compostos (Chemat *et al.*, 2011). Esta categoria inclui a sonicação, que é comumente utilizada para aumentar a eficácia da destruição celular e libertação do conteúdo intracelular de cianobactérias (Babić *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2016; Yasin *et al.*, 2019);
- Microondas – originam a dilatação e rutura das paredes e membranas celulares através de campos elétricos e magnéticos (Christen & Kaufmann, 2002).

Um processo mais simples para proceder à desagregação celular poderá ser a utilização de contas/esferas de vidro de diâmetro apropriado e em volume equivalente à biomassa à qual se pretende proceder à extração (Ismail *et al.*, 2014). Algo que também poderia ter sido feito e a considerar em futuros trabalhos é o processo de re-extração, ou seja, várias extrações consecutivas da mesma biomassa liofilizada. A razão entre a biomassa e o solvente também é um fator importante para uma extração eficiente e, de acordo com algumas publicações, a razão ideal de solvente para peso seco de amostra é de 10:1 (v/p) (Das *et al.*, 2010). Neste trabalho, a razão entre biomassa e solvente foi escolhida de acordo com uma investigação prévia com alecrim para avaliação do potencial antioxidante através de procedimentos semelhantes aos utilizados neste trabalho (Costa, 2013). Em estudos com cianobactérias, a razão entre biomassa e solvente varia muito, não existindo um consenso sobre as proporções mais adequadas (Hajimahmoodi *et al.*, 2010; Guedes *et al.*, 2013b; Ismail *et al.*, 2014; Babić *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2016; Yasin *et al.*, 2019).

A fase de centrifugação também é crucial para uma eficaz separação dos resíduos celulares do sobrenadante. Neste trabalho, a centrifugação foi realizada a 3100 rpm durante 10 minutos. Está descrito que uma velocidade entre os 5000 e 10000 rpm poderá ser a necessária e suficiente para a eficiente centrifugação (e rutura) celular (Ismail *et al.*, 2014; Yasin *et al.*, 2019). No entanto, a velocidade e tempo de centrifugação podem ser lesivos para as células, repercutindo-se negativamente no rendimento do processo. Trata-se, portanto, de encontrar uma condição de equilíbrio entre a centrifugação e a integridade celular.

5.3 Avaliação do perfil antioxidante de estirpes cianobacterianas

De acordo com o ensaio de inibição do radical DPPH, os extratos que apresentaram melhores resultados foram os metanólicos (em % de inibição do radical DPPH e, consequentemente, em equivalentes de Trolox - µg/mL de extrato). Tem sido descrito que o metanol, relativamente ao etanol, apresenta uma maior capacidade de desintegração da membrana/parede celular e de extração de produtos, originando, portanto, maior atividade antioxidante da biomassa analisada (Sharathchandra & Rajashekhar, 2013; Rodríguez-Martel *et al.*, 2017).

No presente trabalho, a capacidade antioxidante expressa em percentagem de inibição do radical DPPH diferiu entre as estirpes (extratos metanólicos) variando entre 4,97 e 10,65 %. Estes resultados são similares aos obtidos por outros autores com extratos metanólicos das espécies *Leptolyngbya protospira* (7,65%), *Nodularia spumigena* (13,02%) e *Phormidiochaete sp.* (14,59%) (Rodríguez-Martel *et al.*, 2017). No entanto, outros autores reportaram valores superiores em *Nostoc sp.*, (28% - 100%) (Zeeshan *et al.*, 2010; Geethu & Shamina, 2018), em *Oscillatoria agardhii* (51% - 92%) e *Anabaena sphaerica* (39% - 62%) (El-Aty *et al.*, 2014) e em *Phormidium fragile* (25,5%), *Lyngbya limnetica* (34,5%), *Scytonema bohnerii* (30,8%) e *Calothrix fusca* (21,3%) (Sharathchandra & Rajashekhar, 2013).

Também os resultados obtidos em estudos com macroalgas apresentam valores extremamente variáveis dependendo das espécies. Chernace *et al.* (2014) obteve percentagens de inibição do radical DPPH entre 10 e 15% em extratos metanólicos de macroalgas a 1 mg/mL. Já Martins *et al.* (2013) obteve percentagens de inibição do radical DPPH entre 11 e 80% em extratos metanólicos de 26 espécies de macroalgas a 1 mg/mL, observando até que algumas das espécies não tinham atividade antioxidante detetável. Neste trabalho os autores testaram 3 concentrações diferentes de extratos metanólicos (0,01; 0,1 e 1 mg/mL) e observaram que em algumas espécies a maior percentagem de inibição foi detetada na concentração de 0,1 mg/mL. Esta ausência de proporcionalidade entre a concentração de biomassa e a percentagem de inibição do radical DPPH também foi observada no presente trabalho com cianobactérias, o que impossibilitou a construção de uma reta para a determinação de EC₅₀ (concentração do extrato que é necessária para gerar uma percentagem de inibição do radical DPPH de 50%). Este parâmetro permitiria comparar os resultados obtidos com um maior número de estudos publicados.

De facto, a comparação dos resultados de vários estudos não é fácil, uma vez que as respectivas condições experimentais diferem bastante entre si. Por exemplo, os processos de extração são diferentes, a quantidade de biomassa usada é muito diversa, bem como os solventes usados e o *end-point* de avaliação da capacidade antioxidante. Isto é possível de observar pelos resultados de outros estudos apresentados na tabela 1.2 do capítulo “Introdução”, onde podemos ver os resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH apresentados em IC₅₀ e equivalentes de ácido ascórbico. Deve ter-se também em consideração as desvantagens e/ou limitações dos ensaios antioxidantes. Apesar do ensaio de inibição do radical DPPH ser simples e muito utilizado na indústria alimentar, determinados compostos com atividade antioxidante podem reagir de forma mais lenta (ou serem inativos) com o DPPH, levando a uma incorreta quantificação da atividade antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

Tem sido descrito que o ensaio de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), que se baseia na reação de ABTS•+ (formado pela reação do ABTS com persulfato de potássio) com compostos com atividade antioxidante (Torres *et al.*, 2017), é mais eficiente e preciso do que o ensaio do DPPH (Singh *et al.*, 2017a). Assim, em trabalhos futuros para determinação da atividade antioxidante de cianobactérias, deverá considerar-se utilizar também este método de modo a complementar os resultados e permitir uma conclusão mais precisa.

Relativamente aos compostos fenólicos, também tem sido descrito que o metanol é mais eficaz que o etanol, pois apresenta uma polaridade superior (El-Aty *et al.*, 2014). Porém, no presente trabalho, foi com a extração etanólica que se observou uma maior concentração de compostos fenólicos na maioria das estirpes testadas, tendo variado entre 34,2 e 123 mg EAG/g de extrato. As estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) foram as que apresentaram maior conteúdo em compostos fenólicos nos extratos etanólicos (102,3 e 123,2 mg EAG/g de extrato, respetivamente). Com os extratos metanólicos obtiveram-se concentrações entre 34,90 e 68,07 mg EAG/g de extrato. Estes valores são equiparáveis, e nalguns casos superiores, aos observados noutros trabalhos. Bavini (2018) obteve um teor total de compostos fenólicos entre 5,4 e 28 µg EAG/mg em extratos etanólicos (com concentração de 10 mg/mL) de 8 estirpes de cianobactérias isoladas de ambientes marinhos e de água doce nacionais e pertencentes à coleção de culturas LEGE-CC (<http://lege.ciimar.up.pt>), sendo os valores mais elevados observados em *Synechocystis salina* e *Phormidium sp.*. Singh *et al.* (2017b) registaram valores de EAG entre 22 e 290 mg/g de peso fresco em extratos metanólicos num estudo com 15 estirpes de diferentes espécies cianobactérias, sendo o valor mais elevado observado na espécie *Oscillatoria acuta*. No entanto, os autores não especificam a concentração dos extratos utilizados. Rajishamol *et al.* (2016) também detetaram um teor de compostos fenólicos superior em *Oscillatoria limosa* (33,4 mg EAG/g), relativamente a *Synechococcus elongatus* (21.33 mg EAG/g) e *Synechocystis aquatilis* (15.94 mg EAG/g), usando uma concentração de biomassa de 100 µg/mL e o metanol como solvente de extração. Aydaş *et al.* (2013) obtiveram valores de EAG entre 26,6 e 78,1 µg/mg em extratos metanólicos de 6 estirpes de cianobactérias com concentração de 0,1 g/mL, sendo o valor máximo de 78,1 µg de EAG/mg de extrato observado na estirpe *Synechocystis sp.* BASO673. El-Aty *et al.* (2014) determinaram o valor de 14,8 e 20,9 mg EAG/g em extratos metanólicos de *Anabaena sphaerica* e *Oscillatoria agardhii*, respetivamente, mas em extratos de água e acetona os valores foram inferiores e não foi indicada a quantidade de biomassa usada. Li *et al.* (2007) obtiveram valores entre 4,38 e 39,9 mg EAG/g em estirpes de *Anabaena flos aquae* (n=1) e *Nostoc ellipsosporum* (n=4), sendo o maior valor obtido com *Nostoc ellipsosporum* (CCAP 1453/17). Porém, neste trabalho também foram usados outros solventes (água, hexano e acetato de etilo) e os autores não indicam a concentração de biomassa extraída. Hossain *et al.* (2016) reportaram concentrações mais baixas de compostos fenólicos em estirpes de *Oscillatoria sp.* (2.96 mg EAG/g), *Lyngbya sp.* (5.02 mg EAG/g), *Microcystis sp.* (2.65 mg EAG/g) e *Spirulina sp.* (1.78 mg EAG/g), mas usaram como solvente de extração a água e não foi descrita a concentração de biomassa usada nas extrações.

Os resultados obtidos neste trabalho podem também ser comparados com estudos feitos em macroalgas. Martins *et al.* (2013) obtiveram valores entre 15 e 569 mg EAG/g em extratos metanólicos de diferentes espécies de macroalgas com concentração de 1 mg/mL. Também Demirel *et al.* (2009) descreveram concentrações de compostos fenólicos entre 10 e 48 mg EAG/g em extratos metanólicos de diferentes espécies de algas castanhas com concentração de 1 mg/mL.

De referir que o método usado para a determinação do conteúdo total em fenólicos se baseia na transferência de eletrões entre o composto fenólico (dador) e o reagente FC (recetor) (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013) e que a quantidade de grupos hidroxil disponíveis na estrutura química dos compostos fenólicos influencia a avaliação da atividade antioxidante dos mesmos, ou seja, um maior número de grupos hidroxil origina uma maior atividade antioxidante (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2009). Assim, apesar de ser um ensaio acessível e fácil de reproduzir, apresenta a desvantagem/limitação do reagente FC não ser específico para compostos fenólicos e poder receber eletrões (ou seja, pode ser reduzido) de vários compostos não fenólicos como vitaminas (C) e minerais (Cu) (Huang *et al.*, 2005).

Relativamente ao conteúdo total em flavonóides, foi nos extratos metanólicos que a maioria das estirpes apresentou o maior teor de EQR (5 das 8 espécies), que variou entre 127,8 e 371,3 mg EQR/g de extrato. Porém, foi no extrato etanólico das estirpes *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) que se registaram os valores mais elevados (900,6 e 605,6 de mg EQR/g de extrato, respetivamente), mantendo-se a tendência atrás referida para os compostos fenólicos. Os flavonóides são um grupo de polifenóis que, devido à sua estrutura conter anéis, apresentam diversas funções hidroxilo semelhantes à dos compostos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Estes resultados são superiores aos previamente reportados para outras cianobactérias. Singh *et al.* (2017a), por exemplo, obtiveram valores cerca de 1000 vezes inferiores em 15 estirpes de cianobactérias (entre 53 e 634 µg EQR/g de peso fresco). Porém, não descreveram a concentração dos extratos. El-Aty *et al.* (2014) testaram extratos metanólicos de duas estirpes de cianobactérias e obtiveram valores de 3,54 mg EQR/g de peso seco (*Anabaena sphaerica*) e 12,11 mg EQR/g de peso seco (*Oscillatoria agardhii*), mas também não especificaram a concentração dos extratos. Hossain *et al.*, (2016) descreveram valores similares ao do presente trabalho, mas em extratos aquosos de 4 cianobactérias, tendo obtido valores de 552.59 mg EQR/g em *Oscillatoria sp.*, 664.07 mg EQR/g em *Lyngbya sp.*, 392.00 mg EQR/g em *Microcystis sp.* e 483.33 mg EQR/g em *Spirulina sp.*. Em macroalgas foram descritas concentrações totais de compostos fenólicos relativamente mais baixas. Osuna-Ruiz *et al.* (2016) obtiveram entre 10 e 14 mg EQR/g peso seco em extratos metanólicos de macroalgas (*Caulerpa sertularioides*, *Codium isabelae*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Padina durvillaei*, *Rhizoclonium riparium*, *Spyridia filamentosa* e *Ulva expansa*), com concentração desconhecida e Raja *et al.* (2016) obteve entre 8 e 55 mg EQR/g peso seco em extratos metanólicos de macroalgas (*Codium fragile*, *Ulva lactuca* e *Eisenia arborea*) em concentração de 2 mg/mL.

O método utilizado na determinação do conteúdo total de flavonóides baseia-se na formação de compostos complexos através da quelação de metais devido à estrutura dos flavonóides (Pełal & Pyrzyńska, 2014). Neste ensaio específico, são formados complexos ácidos estáveis entre o cloreto de alumínio e determinados grupos hidroxilo dos flavonóides originando uma alteração da coloração da solução (Papoti *et al.*, 2011). Embora seja um dos métodos para a determinação de flavonóides mais comuns e utilizados, não deteta todos os diferentes tipos de flavonóides, pelo que é necessário definir mais métodos para tal, como cromatografia, espetrofotometria de massa ou HPLC, entre outros (Chia-Chi *et al.*, 2002; Rijke *et al.*, 2006; Stalikas, 2007).

Em relação aos resultados do ensaio de branqueamento do β-caroteno, é difícil compará-los com outros trabalhos pois a bibliografia sobre este tipo de ensaio com cianobactérias é muito escassa. No presente trabalho os resultados mais elevados foram observados nos extratos etanólicos (em 6 das 8 estirpes testadas), o que pode ser explicado pelo facto do β-caroteno ter uma melhor solubilidade em etanol (Popova, 2017). Nestes extratos os melhores resultados foram obtidos nas estirpes

Aphanizomenon flos-aquae (LMECYA 088) e *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) com 828,94 e 690,47 ACC, respetivamente, mantendo-se a tendência dos ensaios de determinação do conteúdo total de fenólicos e flavonóides. Em estudos com microalgas (*Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chlorella vulgaris*), Rodriguez-Garcia & Guil-Guerrero (2008) obtiveram valores de AAC entre 600 e 5000 em extratos etanólicos na concentração de 1 mg/mL, tendo afirmado que foram dos valores de AAC mais altos alguma vez registados em extratos biológicos com este método. No entanto, este artigo é dos poucos que apresenta os resultados expressos em AAC, pois a maioria reporta os resultados em percentagem de inibição. Cakmak *et al.* (2014), num dos seus trabalhos com a microalga *Dunaliella salina*, uma microalga comercializada devido à sua grande capacidade de acumular β -caroteno (Hejazi *et al.*, 2004), obteve uma percentagem de inibição contra a oxidação do ácido linoleico de 68,88% em extrato etanólico a uma concentração de 2 mg/mL. Os autores observaram também, que a percentagem de inibição foi mais elevada no extrato etanólico do que no metanólico. Relativamente a trabalhos com macroalgas (*Gracilaria birdiae* e *Gracilaria cornea*), Souza *et al.* (2011) observaram valores de percentagem de atividade antioxidante entre 25 e 35% em extratos etanólicos com concentração de 1 mg/mL, sendo que nos extratos metanólicos os valores foram mais baixos. Ismail & Tan, (2002) observaram percentagens de atividade antioxidante entre os 5 e 55% em extratos etanólicos com concentração de 1 mg/mL, em algas comercialmente disponíveis (*Porphyra sp.*, *Laminaria sp.*, *Undaria sp.* e *Hijikia sp.*).

O ensaio de branqueamento do β -caroteno baseia-se na reação entre o β -caroteno e o radical lipídico peroxil, que origina uma alteração da coloração da solução (Moon & Shibamoto, 2009). Este ensaio é muito utilizado para a avaliação da atividade antioxidante na indústria alimentar. No entanto, devido a semelhanças estruturais entre o β -caroteno e outros compostos (fulerenos), este método pode ser impreciso (Ueno *et al.*, 2014).

Tendo em consideração os resultados obtidos nos diferentes ensaios para a determinação da atividade antioxidante de compostos bioativos produzidos pelas cianobactérias testadas, as estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) devem ser consideradas para trabalhos futuros, pois foram as estirpes que obtiveram os melhores resultados em 3 dos 4 ensaios realizados. Estas estirpes foram também as que obtiveram os maiores rendimentos de biomassa, o que constitui uma vantagem para o processo de produção de larga escala relativamente às outras estirpes testadas neste trabalho. No entanto, é importante realçar o resultado da estirpe *Planktothrix mougeotii* (LEGE06224) no ensaio do sistema de inibição do radical DPPH, pois foi a única cujos resultados em ambos os solventes não diferiram significativamente, rondando os 9%. O fato de esta estirpe ter sido isolada de uma ETAR, pode justificar este resultado, uma vez que o ambiente hostil da ETAR pode influenciar a produção de compostos com atividade antioxidante (Safafar *et al.*, 2015).

Um dos trabalhos que poderá ser realizado de futuro é a identificação do tipo de compostos fenólicos e flavonóides e/ou outros que são produzidos por estas estirpes, de forma a otimizar as aplicações biotecnológicas que poderão vir a ter. O género *Aphanizomenon* é atualmente produzido em vários países e utilizado para produtos alimentares e farmacêuticos (Bishop & Zubeck, 2012). Existem vários estudos com este género, principalmente com a espécie *Aphanizomenon flos-aquae*, que atribuem a sua atividade antioxidante ao pigmento ficocianina, sugerindo que o consumo desta cianobactéria poderá ser eficaz contra o *stress* oxidativo e que poderá ter um efeito anti-inflamatório (Benedetti *et al.*, 2004). Este pigmento está a começar a substituir, principalmente em produtos alimentares, determinados pigmentos sintéticos e a ser aplicado como aditivo para alimentação animal (Brain & Caldwell, 2018).

Seria também interessante testar uma maior diversidade de estirpes de cianobactérias e comparar as diferenças na produção/acumulação de compostos bioativos (incluindo os que apresentem atividade antioxidante) entre estirpes bentónicas e planctónicas para explorar a possibilidade de as estirpes planctónicas, devido ao fato de poderem regular a sua posição na coluna de água e posicionar-se mais

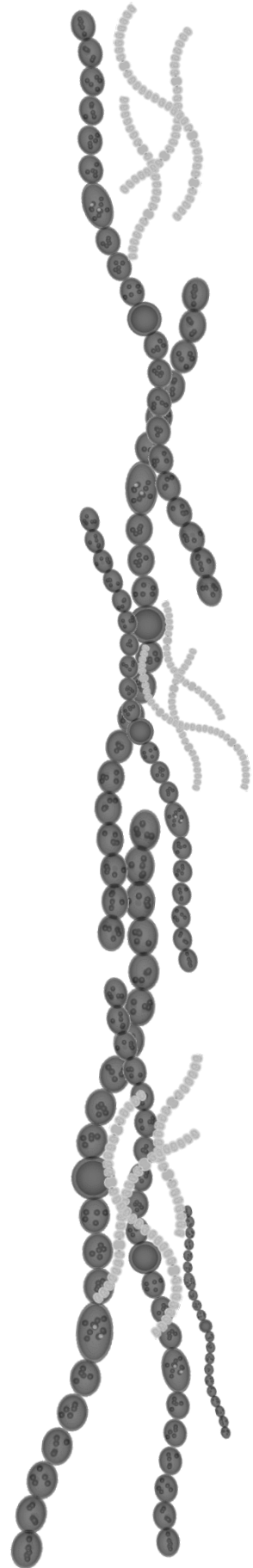
perto da superfície, poderem estar expostas a uma maior quantidade de luz e, consequentemente, produzirem uma maior quantidade/diversidade destes compostos.

A seleção de estirpes para trabalhos deste género deve ter em conta que a produção de compostos bioativos está influenciada pela própria estirpe e pelas condições de crescimento, pois estirpes que se desenvolvem em condições laboratoriais ótimas não terão a necessidade de produzir tais compostos quando comparadas com estirpes que se desenvolvem em condições de *stress*.

5.4 Avaliação do efeito protetor de extratos de cianobactérias contra o efeito de H₂O₂ na linha celular HEK293T

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos das 8 estirpes investigadas neste trabalho também foi testada em relação à sua capacidade de proteger células humanas do *stress* oxidativo provocado por H₂O₂. Os modelos de linhas celulares humanas sob *stress* oxidativo induzido por H₂O₂ costumam ser usados em estudos da atividade antioxidante de compostos de origem natural, designadamente as células HEK293 (*Human embryonic kidney cells*) (Bian *et al.*, 2015; Grauzdytė *et al.*, 2018), que foi o modelo usado no presente trabalho (HEK293T). Os resultados demonstram que a pré-exposição a todos os extratos cianobacterianos aumenta a viabilidade das células sujeitas ao efeito oxidativo de H₂O₂. A sobrevivência foi maior (entre 7% e 53%) nas células pré expostas durante 1 h aos extratos e tratadas com 0,1 mM de H₂O₂ durante 23h do que nas células pré expostas aos extratos durante 23 horas e tratadas com 1 mM de H₂O₂ durante 3 h (entre 8% e 30%). Ou seja, os resultados demonstraram que o efeito protetor dos extratos contra o efeito oxidativo do H₂O₂ depende do tempo de exposição aos extratos e/ou da concentração do agente oxidante. Esta foi uma primeira abordagem a este tipo de estudo. De futuro, dever-se-ia testar uma gama mais alargada de combinações entre extrato e H₂O₂, relativamente às suas concentrações e tempos de exposição, bem como outras linhas celulares humanas adequadas a este tipo de estudo. De referir que os extratos utilizados nestes ensaios foram extraídos cerca de duas semanas antes do teste com as células HEK293T pelo que podem ter perdido alguma atividade enquanto estiveram armazenados. As estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE06224) foram as que induziram uma maior sobrevivência celular. O género *Leptolyngbya* é muito estudado quanto à produção de compostos bioativos com propriedades anticancerígenas e alguns foram já isolados (Costa *et al.*, 2014). No entanto, não existem muitos trabalhos publicados a respeito do efeito protetor de extratos de cianobactérias em células humanas expostas a *stress* oxidativo induzido por H₂O₂, tal como foi já descrito para outros compostos naturais como o ácido ferrúlico, um fenólico natural presente em plantas e frutos (Bian *et al.*, 2015) e organismos como a planta *Phyllanthus phillyreifolius*, endógena da ilha da Reunião e usada em medicina tradicional (Grauzdytė *et al.*, 2018). No entanto, um estudo de Badr *et al.* (2019) revelou uma diminuição de marcadores de *stress* oxidativo e um aumento nas defesas antioxidantes endógenas em ratos sob *stress* oxidativo induzido por H₂O₂, ao consumirem oralmente um extrato da estirpe de cianobactéria *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*. No presente trabalho, os extratos que conferiram maior proteção às células HEK293T contra o efeito do H₂O₂ não foram as que apresentaram maior teor em compostos fenólicos e flavonóides, o que sugere que outro tipo de compostos possa estar envolvido na atividade antioxidante observada. Seria interessante esclarecer se essa proteção se deve à capacidade dos extratos de sequestrar radicais livres de oxigénio ou ao seu poder redutor e identificar que tipo de compostos estarão presentes nos extratos.

6. Conclusão



O facto de as cianobactérias apresentarem características metabólicas únicas, de ocorrerem em habitats com condições muito variadas, nalguns casos extremas, e de terem grande capacidade de adaptação ao ambiente, torna-as em promissoras fontes naturais de compostos bioativos com potencial aplicação biotecnológica. Os perfis de bioatividade das cianobactérias dependem das espécies e das condições ambientais, pelo que é importante proceder à análise do potencial biotecnológico numa variedade alargada destes organismos, de forma a seleccionar as mais promissoras.

Neste trabalho foi avaliado o perfil antioxidante de 7 estirpes de cianobactérias isoladas de várias albufeiras nacionais e de 1 estirpe isolada de uma ETAR, mantidas nas coleções de culturas ESSACC e LEGE-CC, respetivamente. Foi igualmente avaliado o efeito protetor de extratos etanólicos destas estirpes na linha celular humana HEK293T contra o efeito oxidativo de peróxido de hidrogénio.

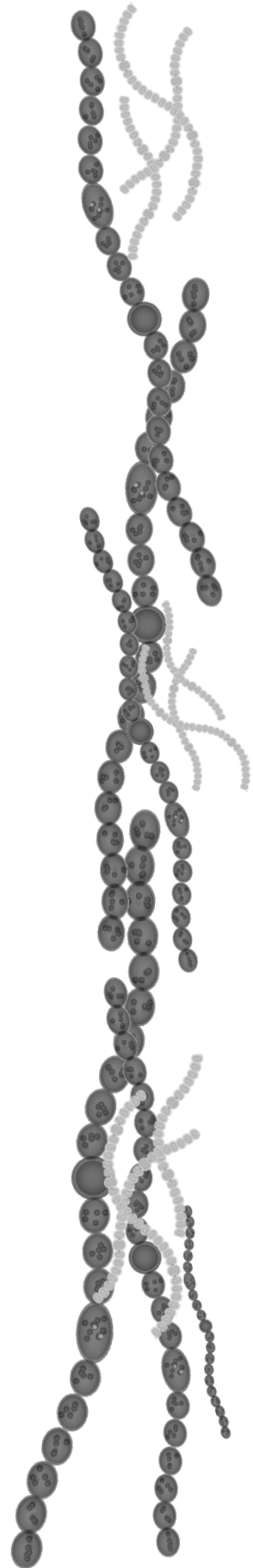
Os objetivos propostos para este trabalho foram cumpridos e as principais conclusões obtidas são as seguintes:

- As estirpes testadas apresentam atividade antioxidante (inibição do radical DPPH e branqueamento do β -caroteno) e concentrações totais de compostos fenólicos e flavonóides similares ou superiores às que têm sido descritas na literatura científica para cianobactérias;
- As estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009) e *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) são as mais promissoras, de entre as que foram avaliadas, visto terem apresentado os valores mais elevados de compostos com atividade antioxidante em 3 dos 4 ensaios realizados;
- Os extratos de todas as cianobactérias estudadas conferiram um efeito protetor na linha celular HEK293T contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogénio, sobretudo os extratos etanólicos das estirpes *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224);
- A otimização das condições de cultura e extração da biomassa assim como a escolha dos métodos de análise são fatores críticos na caracterização do perfil antioxidante das cianobactérias.

Como perspetivas de trabalho futuro, salienta-se o interesse de otimizar o processo de produção de biomassa de cianobactérias e extração de compostos com atividade antioxidante, designadamente a re-extração e/ou a extração sequencial com diferentes solventes, incluindo não tóxicos, passíveis de serem utilizados em produtos alimentares e cosméticos. Salienta-se também, o interesse em identificar os mecanismos subjacentes à atividade antioxidante das cianobactérias e de caracterizar quimicamente esses compostos.

As cianobactérias são organismos cuja manutenção e produção é relativamente fácil e economicamente viável, podendo apresentar um maior rendimento de produção de compostos bioativos do que os organismos eucariotas. Trata-se de uma área de investigação de grande interesse e potencial, designadamente nas áreas da alimentação/nutrição, farmacêutica, produção de biodiesel e remediação ambiental.

7. Referências



- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Abeynayaka, H. D. L., Asaeda, T., & Kaneko, Y. (2017). Buoyancy Limitation of Filamentous Cyanobacteria under Prolonged Pressure due to the Gas Vesicles Collapse. *Environmental Management*, 60(2), 293–303. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0875-7>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450–472. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2087222%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC372789> Acedido a: 14 de Abril de 2019
- Andrade, M. A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K., & Ramos, F. (2019). Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications? *Trends in Food Science and Technology*, 86, 68–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.010>
- Angermayr, S. A., Hellingwerf, K. J., Lindblad, P., & Teixeira de Mattos, M. J. (2009). Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.011>
- Athmouni, K., Belhaj, D., El Feki, A., & Ayadi, H. (2018). Optimization, antioxidant potential, modulatory effect and anti-apoptotic action in of Euphorbia biconae polysaccharides on hydrogen peroxide-induced toxicity in human embryonic kidney cells HEK293. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.172>
- Aydaş, S. B., Ozturk, S., & Aslim, B. (2013). Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry*, 136(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.119>
- Babić, O., Kovač, D., Rašeta, M., Šibul, F., Svirčev, Z., & Simeunović, J. (2016). Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2333–2342. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0773-4>
- Badr, O. A. M., EL-Shawaf, Ibrahi, I. S., El-Garhy, H. A. S., Moustafa, M. M. A., & Ahmed-Farid, O. A. (2019). The potent therapeutic effect of novel cyanobacterial isolates against oxidative stress damage in redox rats. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1278–1289. <https://doi.org/10.1111/jam.14200>
- Bandaranayake, W. M. (1997). Mycosporines : are they nature ' s sunscreens? *Natural Product Reports*, 15(2), 159–172. <https://doi.org/10.1039/A815159Y>
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O'Leary, S. J. B. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1>
- Barahuie, F., Hussein, M. Z., Fakurazi, S., & Zainal, Z. (2014). Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7750–7786. <https://doi.org/10.3390/ijms15057750>
- Bavini, J. M. (2018). *Cyanobacteria in Skin Protection*. Tese de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto. 1-90. Retirado de

<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/118610/2/311491.pdf> Acedido a: 29 de Julho de 2019

- Ben Saad, H., Ben Amara, I., Kharrat, N., Giroux-Metgès, M. A., Hakim, A., Zeghal, K. M., & Talarmin, H. (2018). Cytoprotective and antioxidant effects of the red alga *Alsidium corallinum* against hydrogen peroxide-induced toxicity in rat cardiomyocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(1), 35–43. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1437184>
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*, 75(19), 2353–2362. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.06.004>
- Berry, J. P., Gantar, M., Perez, M. H., Berry, G., & Noriega, F. G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6(2), 117–146. <https://doi.org/10.3390/md6020117>
- Bertocchi, C., Navarini, L., & Cesàro, A. (1990). Review paper polysaccharides from Cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers*, 12(2), 127–153. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90015-K](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90015-K)
- Bian, Y. Y., Guo, J., Majeed, H., Zhu, K.-X., Guo, X.-N., Peng, W., & Zhou, H.-M. (2015). Ferulic acid renders protection to HEK293 cells against oxidative damage and apoptosis induced by hydrogen peroxide. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 51(7), 722–729. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9876-0>
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(5), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Boonpeng, S., Siripongvutikorn, S., Sae-wong, C., & Sutthirak, P. (2014). The antioxidant and anti-cadmium toxicity properties of garlic extracts. *Food Science and Nutrition*, 2(6), 792–801. <https://doi.org/10.1002/fsn3.164>
- Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2014). Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>
- Brain, C. M., & Caldwell, G. S. (2018). Method for the Synthesis of Phycocyanin - *Patent No. 15 / 889*, 936. Estados Unidos da América. Retirado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/a7/d7/1d/6dff819cd167f2/US20180155401A1.pdf> Acedido a 16 de Setembro de 2019
- Breitenbach, J., Nogueira, M., Farré, G., Zhu, C., Capell, T., Christou, P., Fleck G., Focken U., Fraser D. P. & Sandmann, G. (2016). Engineered maize as a source of astaxanthin: processing and application as fish feed. *Transgenic Research*, 25(6), 785–793. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9971-3>
- Bruggisser, R., Von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(5), 445–448. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32073>
- Cakmak, Y. S., Kaya, M., & Asan-Ozusaglam, M. (2014). Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *EXCLI Journal*, 13, 679–

690. Retirado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464408/pdf/EXCLI-13-679.pdf> Acedido a 23 de Novembro de 2018
- Camacho, A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (2000). Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 148(3), 333–355. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/148/2000/333>
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos S., Torres M. A., Souza A. O., Colepicolo P. & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146(1–2), 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007>
- Carmichael, W. W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria : “ The CyanoHABs .” *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(5), 1393–1407. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/20018091095087>
- Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2015). Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 871–886. <https://doi.org/10.3390/ijms16010871>
- Castenholz, R. W. (2015). General Characteristics of the Cyanobacteria . *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Cheng, A.-X., Lou, Y.-G., Mao, Y.-B., Lu, S., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2007). Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2006.00395.x>
- Chernace, H., Mansori, M., Latique, S., & El Kaoua, M. (2014). Evaluation of Antioxidant Capacity of Methanol Extract and Its Solvent Fractions Obtained From Four Moroccan Macro Algae Species. *European Scientific Journal*, 10(15), 35–48. <https://doi.org/10.19044/esj.2014.v10n15p%p>
- Chia-Chi, C., Ming-Hua, Y., Hwei-Mei, W., & Jiing-Chuan, C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. Retirado de <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56e7bc5d40485449e6223f71&assetKey=AS%3A339806593798145%401458027613155> Acedido a: 25 de Setembro de 2019
- Choochote, W., Suklampoo, L., & Ochaikul, D. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0084-6>
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794–799. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460>
- Christen, P., & Kaufmann, B. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products : Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, 113(13), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.631>
- Churro, C., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V. C., Bento, A. J., Prabhakar S., Lobo A.

- M., Calado A. J. & Pereira, P. (2009). Effects of bacillamide and newly synthesized derivatives on the growth of cyanobacteria and microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9388-3>
- Clark, J. (2013). Definitions of Oxidation and Reduction (Redox). Retirado de: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/redox/definitions.html> Acedido a: 1 de Novembro de 2019
- Costa, D. (2013). *Embalagens activas com propriedades antioxidantes: desenvolvimento de um método analítico e avaliação da segurança alimentar*. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-135
- Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M. S., Ribeiro, M. J., Fernandes, M. H., Barros P., Barreiro A., Vasconcelos V. & Martins, R. (2014). Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: High potential as a source of anticancer compounds. *Marine Drugs*, 12(1), 98–114. <https://doi.org/10.3390/md12010098>
- Dang, T. T., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2018). Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 174–181. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13571>
- Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104–111. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- de Abreu, D. A., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277–1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.019>
- De Alencar, D. B., Diniz, J. C., Rocha, S. A. S., Pires-Cavalcante, K. M. S., De Lima, R. L., De Sousa, K. C., Freitas J. O., Bezerra R. M., Baracho B. M., Sampaio A. H., Viana, F. A. & Saker-Sampaio, S. (2018). Fatty acid composition from the marine red algae *pterocladia capillacea* (S. G. gmelin) santelices & hommersand 1997 and *osmundaria obtusiloba* (C. agardh) R. E. norris 1991 and its antioxidant activity. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(1), 449–459. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160315>
- de Jesus Raposo, M. F., de Moraes, A. M. B., & de Moraes, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(5), 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- de Jesus Raposo, M. F., de Moraes, R. M. S. C., & de Moraes, A. M. M. B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, 93(15), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>
- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F., Karabay-Yavasoglu, U., Ozdemir, G., & Sukatar, A. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean sea. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(6), 619–628. <https://doi.org/10.2298/jsc0906619d>
- Dias, E., Pereira, P., & Franca, S. (2002). Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. *Lmecya* (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 38(4), 705–712. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01146.x>
- Dinsdale, M. T., & Walsby, A. E. (1972). The interrelations of cell turgor pressure, gas-vacuolation, and

- buoyancy in a blue-green alga. *Journal of Experimental Botany*, 23(75), 561–570. <https://doi.org/10.1093/jxb/23.2.561>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S., & Bhattacharya, S. K. (2005). Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 36–46. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-36>
- Dvořák, P., Casamatta, D. A., Hašler, P., Jahodářová, E., Norwich, A. R., & Pouličková, A. (2017). Diversity of the Cyanobacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects* (pp. 3–46). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5>
- Dvořák, P., Pouličková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D. A., & Papini, A. (2015). Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 739–757. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0888-6>
- El-Aty, A. M. A., Mohamed, A. A., & Samhan, F. A. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activities of two fresh water Cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(7), 69–75. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40712>
- El-Bestawy, E. (2008). Treatment of mixed domestic-industrial wastewater using cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1503–1516. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0452-4>
- Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058>
- Flores, E., & Herrero, A. (2014). *The cell biology of cyanobacteria* (E. Flores & A. Herrero, Eds.). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Gademann, K. (2007). Cyanobacterial Natural Products for the Inhibition of Biofilm Formation and Biofouling. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 61(6), 373–377. <https://doi.org/10.2533/chimia.2007.373>
- Gademann, K., & Portmann, C. (2008). Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*, 12(4), 326–341. <https://doi.org/10.2174/138527208783743750>
- Galhano, V., de Figueiredo, D. R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M. J., Gomes-Laranjo, J., & Peixoto,

- F. (2011). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia*, 663(1), 187–203. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0572-5>
- Gantar, M., & Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. *Journal of Phycology*, 44(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x>
- Gayathri, M., Kumar, P. S., Prabha, A. M. L., & Muralitharan, G. (2015). In vitro regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. *Algal Research*, 7, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.009>
- Geethu, V., & Shamina, M. (2018). Antioxidant activity of cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* C.Agardh ex Born. & Flah. *Journal of Algal Biomass Utilization* 9(1), 26–30. Retirado de <http://jalgalmass.com/paper3vol9no3.pdf> Acedido a: 2 de Outubro de 2019
- Giannuzzi, L. (2018). Cyanobacteria Growth Kinetics. In *Algae*. (Wong Y. K. Eds). Londres, UK: IntechOpen. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>
- Goh, S.-H., Yusoff, F. M., & Loh, S.-P. (2010). A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, *Chaetoceros* sp. and a green microalga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science*, 2(3), 123–130. <https://doi.org/10.5539/jas.v2n3p123>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gouveia, A. P. B. L., Sousa, I., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in Novel Food Products. In *Papadoupoulos, K. - Food Chemistry Research Developments*. Nova Iorque, EUA: Nova Science Publishers.
- Grauzdytė, D., Pukalskas, A., Viranaicken, W., El Kalamouni, C., & Venskutonis, P. R. (2018). Protective effects of *Phyllanthus phillyreifolius* extracts against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HEK293 cells. *PloS One*, 13(11), e0207672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207672>
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Gião, M. S., & Malcata, F. X. (2013a). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 138(1), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.106>
- Guedes, A. C., Gião, M. S., Seabra, R., Ferreira, A. C. S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., & Malcata, F. X. (2013b). Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11(4), 1256–1270. <https://doi.org/10.3390/md11041256>
- Guihéneuf, F., Khan, A., & Tran, L.-S. P. (2016). Genetic Engineering: A Promising Tool to Engender Physiological, Biochemical, and Molecular Stress Resilience in Green Microalgae. *Frontiers in*

- Guiry, M. D & Guiry G.M. (2019). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retirado de <https://www.algaebase.org/> Acedido a: 2 de Novembro de 2019
- Guzman, S., Gato, A., & Calleja, J. M. (2001). Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 15(3), 224–230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.715>
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>
- Hejazi, M. A., Holwerda, E., & Wijffels, R. H. (2004). Milking Microalga *Dunaliella salina* for β -Carotene Production in Two-Phase Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5), 475–481. <https://doi.org/10.1002/bit.10914>
- Hemalatha, A., Girija, K., Parthiban, C., Saranya, C., & Anantharaman, P. (2013). Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom *Navicula clavata* and green microalgae *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, 4(5), 151–157. Retirado de https://www.researchgate.net/profile/Girija_Karthik/publication/257765874_Antioxidant_properties_and_total_phenolic_content_of_a_marine_diatom_Navicula_clavata_and_green_microalgae_Chlorella_marina_and_Dunaliella_salina/links/00b49525d4d88e1a0c000000.pdf Acedido a: 26 de Outubro de 2019
- Herrero, M., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2006). Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5597–5603. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf060546q>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hirschberg, J., & Chamovitz, D. (1994). Carotenoids in Cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 559–560). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Hossain, M. F., Ratnayake, R. R., Meerajini, K., & Wasantha Kumara, K. L. (2016). Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from fresh water bodies of Sri Lanka. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 753–758. <https://doi.org/10.1002/fsn3.340>
- Huang, D., Ou, B., & L. Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- Hussain, A., & Hasnain, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria.

- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 85–92.
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0833-3>
- Ishikawa, T., Ohta, Y., Takeda, T., Shigeoka, S., & Nishikimi, M. (1998). Increased cellular resistance to oxidative stress by expression of cyanobacterium catalase-peroxidase in animal cells. *FEBS Letters*, 426(2), 221–224. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00347-0)
- Ismail, M. M. S., El-Ayouty, Y. M., & Piercey-Normore, M. D. (2014). Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1223–1230. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0763-1>
- Ismail, A., & Tan, S. H. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Malaysian Journal of Nutrition*, 8(2), 167–177. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22692475> Acedido a: 13 de Outubro de 2019
- Isman, M. B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science*, 74(9), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>
- Jahan, A., Ahmad, I. Z., Fatima, N., Ansari, V. A., & Akhtar, J. (2017). Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: a review. *Phycologia*, 56(4), 410–422. <https://doi.org/10.2216/15.58.1>
- Ju, H. Y., Chen, S. C., Wu, K. J., Kuo, H. C., Hseu, Y. C., Ching, H., & Wu, C. R. (2012). Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of Fructus Ligustri Lucidi with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.036>
- Karlson, B., Andreasson, A., Johansen, M., Karlberg, M., Loo, A. & Skjevik, A-T. (2018). Nordic Microalgae. World-wide electronic publication. Retirado de <http://nordicmicroalgae.org> Acedido a: 31 de Outubro de 2019
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Nain, L., & Kaushik, B. D. (2007). Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *European Journal of Soil Biology*, 43(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.11.001>
- Klein, B. C., Walter, C., Lange, H. A., & Buchholz, R. (2012). Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1133–1139. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9743-7>
- Komárek, J. (2013). *Süßwasserflora von Mitteleuropa [Freshwater Flora of Europe] Bd. 19/3: Cyanoprokaryota: Heterocytous Genera*. Springer Spektrum.
- Komárek, J. (2007). Phenotype diversity of the cyanobacterial genus *Leptolyngbya* in the maritime Antarctic. *Polish Polar Research*, 28(3), 211–231. Retirado de <http://www.polish.polar.pan.pl/ppr28/PPR28-211.pdf> Acedido a: 26 de Novembro de 2019
- Komárek, J., & Konstantinos, A. (2005). *Süßwasserflora von Mitteleuropa [Freshwater Flora of Europe], Bd 19/2: Oscillatoriales* (B. Burkhard, G. Gärtner, L. Krienitz, & M. Schagerl, Eds.). Springer Spektrum.

- Komárek, J., & Konstantinos, A. (2008). *Süßwasserflora von Mitteleuropa [Freshwater Flora of Europe], Bd 19/1: Cyanoprokaryota: Chroococcales*. Springer Spektrum.
- Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2019). Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, 7421, 327–346. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814667-5.00016-7>
- Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C.-C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 258–278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>
- Lee, R. E. (2018). Phycology. In *Phycology* (4th ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Lee, S. H., Lee, J. B., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2010). Antioxidant properties of tidal pool microalgae, *Halochlorococcum porphyrae* and *Oltamanssiellopsis unicellularis* from Jeju Island, Korea. *Algae*, 25(1), 45–56. <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.1.045>
- Li, H. Bin, Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Lindblad, P. (1999). Cyanobacterial H₂ metabolism: Knowledge and potential strategies for a photobiotechnological production of H₂. *Biotechnologia Aplicada*, 16(3), 141–144. Retirado de <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/1999/16/3/141-144.pdf> Acedido a: 15 de Novembro de 2019
- Liu, L., Herfindal, L., Jokela, J., Shishido, T. K., Wahlsten, M., Døskeland, S. O., & Sivonen, K. (2014). Cyanobacteria from terrestrial and marine sources contain apoptogens able to overcome chemoresistance in acute myeloid leukemia cells. *Marine Drugs*, 12(4), 2036–2053. <https://doi.org/10.3390/md12042036>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In M. J. Stoddart (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. 1–253. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Martins, C. D. L., Ramlov, F., Nocchi Carneiro, N. P., Gustinari, L. M., dos Santos, B. F., Bento, L. M., Lhullier C., Gouvea L., Bastos E., Horta P. A. & Soares, A. R. (2013). Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9918-x>
- Martins, J., Peixe, L., & Vasconcelos, V. M. (2011). Unraveling Cyanobacteria Ecology in Wastewater Treatment Plants (WWTP). *Microbial Ecology*, 62(2), 241–256. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9806-y>
- Meerloo, J. Van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cancer Cell Culture: Cell sensitivity assays: The MTT assay. In *Cancer cell culture*. 237–245. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5>
- Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. A. (2017). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis* (J. Meriluoto, L. Spoof, & G. A. Codd, Eds.). Nova Iorque, EUA: John Wiley & Sons.
- Miller, H. E. (1971). A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>
- Mišurcová, L., Orsavová, J., & Ambrožová, J. V. (2015). Algal Polysaccharides and Health. In K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (pp. 109–144).

https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_24

- Moon, J-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V. & Martins, R. (2019). Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. *Algal Research*, 41, 101541. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2001). Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. *Food Research International*, 34(2–3), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00136-8)
- Mur, L. R., Skulberg, O. M., & Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment. In I. Chorus & J. Bartram (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1-400. London and New York: E & FN Spon.
- Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
- Obinger, C., Regelsberger, G., Pircher, A., Strasser, G., & Peschek, G. A. (1998). Scavenging of superoxide and hydrogen peroxide in blue-green algae (cyanobacteria). *Physiologia Plantarum*, Vol. 104, pp. 693–698. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040425.x>
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C.-M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M., & Hurtado-Oliva, M. A. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2196–2210. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150305>
- Paliwal, C., Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., ... Mishra, S. (2016). Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research*, 15, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.017>
- Pandey, V. D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 89-97. Retirado de <https://pdfs.semanticscholar.org/fad2/37ffcae20eaba4fbb62851d1b4d33a025f12.pdf> Acedido a: 6 de Outubro de 2019
- Papoti, V. T., Xystouris, S., Papagianni, G., & Tsimidou, M. Z. (2011). “Total flavonoid” content assessment via aluminum [Al(III)] complexation reactions. What we really measure? *Italian Journal of Food Science*, 23(3), 252–259. Retirado de: <http://www.chiriotti.it/pdf/ijfs/IJFS233.pdf#page=28> Acedido a: 2 de Novembro de 2019
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2014). Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Research International*, 65, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.015>

- Patel, A., Mishra, S., & Ghosh, P. K. (2006). Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 43(1), 25–31. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.015>
- Patel, V. E. (2016). *Range of antioxidant metabolites with biotechnological potential from Alkaliphilic cyanobacteria*. Tese de Doutorado em Filosofia em Biotecnologia. Faculdade de Ciências. Universidade do Norte Maharashtra. Jalgaon. 1-156. Retirado de <http://14.139.13.47:8080/jspui/handle/10603/136564> Acedido a 6 de Outubro de 2018
- Patel, V. K., Sundaram, S., Patel, A. K., & Kalra, A. (2017). Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(1), 109–121. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2666-0>
- Pathak, J., Pandey, A., Maurya, P. K., Rajneesh, R., Sinha, R. P., & Singh, S. P. (2019). Cyanobacterial Secondary Metabolite Scytonemin: A Potential Photoprotective and Pharmaceutical Compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01134-5>
- Pattanaik, B., & Lindberg, P. (2015). Terpenoids and Their Biosynthesis in Cyanobacteria. *Life*, 5(1), 269–293. <https://doi.org/10.3390/life5010269>
- Paulino, S., Sam-Bento, F., Churro, C., Alverca, E., Dias, E., Valério, E., & Pereira, P. (2009). The Estela Sousa e Silva Algal Culture Collection: A resource of biological and toxicological interest. *Hydrobiologia*, 636(1), 489–492. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9977-4>
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Popova, A. V. (2017). Spectral characteristics and solubility of β -carotene and zeaxanthin in different solvents. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare Des Sciences*, 70(1), 53–60. Retirado de https://mafiadoc.com/download/spectral-characteristics-and-solubility-of-carotene-_5aa4082b1723dd8b9d04e7ce.html Acedido a 2 de Setembro de 2019
- Prasanna, R., Kumar, R., Sood, A., Prasanna, B. M., & Singh, P. K. (2006). Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. *Microbiological Research*, 161(3), 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.001>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004, November). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Arunkumar, K., & Carvalho, I. S. (2016). Antioxidant activity and lipid profile of three seaweeds of Faro, Portugal. *Revista Brasileira de Botanica*, 39(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0200-8>
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek J. & Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 11–26. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63276-0>
- Rajishamol, M. P., Lekshmi, S., Vijayalakshmy, K. C., & Saramma, A. V. (2016). Antioxidant activity of Cyanobacteria isolated from Cochin estuary. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 45(8), 974–977. Retirado de

<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/35181/1/IJMS%2045%288%29%20974-977.pdf>
Acedido: a 26 de Novembro de 2018

- Rao, A. R., Sarada, R., Baskaran, V., & Ravishankar, G. A. (2006). Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4593–4599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf060799j>
- Rastogi, R. P., & Sinha, R. P. (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009>
- Rastogi, R. P., Sinha, R. P., Singh, S. P., & Häder, D. P. (2010). Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 537–558. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0718-5>
- Rastogi, R. P., Sonani, R. R., & Madamwar, D. (2015). Cyanobacterial Sunscreen Scytonemin: Role in Photoprotection and Biomedical Research. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1551–1563. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1676-1>
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790–795. <https://doi.org/10.1042/bst0240790>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Rijke, E. de, Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- Rodríguez-García, I., & Guil-Guerrero, J. L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, 108(3), 1023–1026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.059>
- Rodríguez-Martel, G., Rico, M., García-Poza, S., Afonso-Olivares, C., Gómez-Pinchetti, J. L., & Jerez-Martel, I. (2017). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2924508>
- Safafar, H., van Wageningen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Samuilov, V. D., Bezryadnov, D. B., Gusev, M. V., Kitashov, A. V., & Fedorenko, T. A. (2001). Hydrogen peroxide inhibits photosynthetic electron transport in cells of cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 66(6), 640–645. <https://doi.org/10.1023/A:1010207314408>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2008). Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial Biotechnology*, 1(4), 283–319. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00015.x>

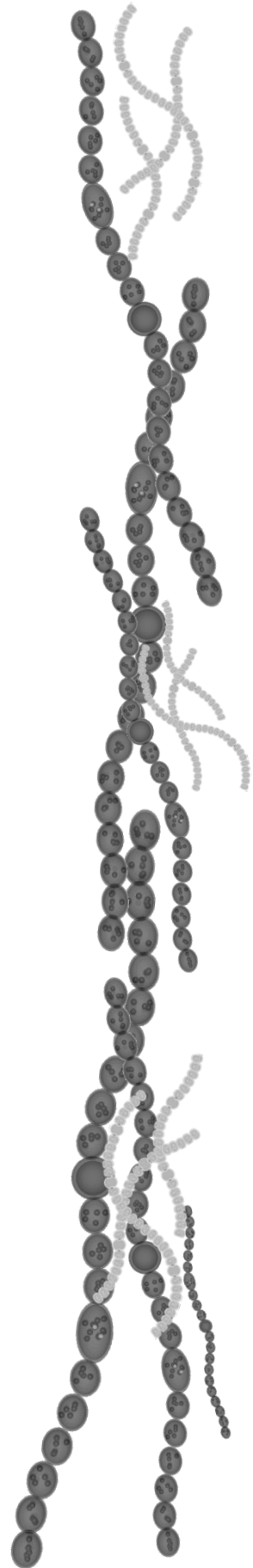
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56936-4_2
- Schaeffer, D. J., Malpas, P. B., & Barton, L. L. (1999). Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(1), 73–80. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1816>
- Schrader, K. K., De Regt, M. Q., Tucker, C. S., & Duke, S. O. (1997). A Rapid Bioassay for Selective Algicides. *Weed Technology*, 11(4), 767–774. <https://doi.org/10.1017/s0890037x00043414>
- Seino, Y., Miki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Fujimoto, W., Kimura, K., Takeuchi A., Takahashi Y., Oiso Y., Iwanaga T. & Seino, S. (2008). Isx participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of β -carotene 15,15'-monooxygenase (Bcmo1) expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4905–4911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707928200>
- Sharathchandra, K., & Rajashekhar, M. (2013). Antioxidant activity in the four species of cyanobacteria isolated from a sulfur spring in the western ghats of karnataka. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), 275–285. Retirado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.587.6659&rep=rep1&type=pdf>
Acedido a: 30 de Setembro de 2019
- Shene, C., Monsalve, M. T., Vergara, D., Lienqueo, M. E., & Rubilar, M. (2016). High pressure homogenization of *Nannochloropsis oculata* for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(4), 631–639. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500011>
- Silva-Stenico, M. E., Silva, C. S. P., Lorenzi, A. S., Shishido, T. K., Etchegaray, A., Lira, S. P., Moraes L. A. B & Fiore, M. F. (2011). Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, 166(3), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.002>
- Singh, D. P., Prabha, R., Verma, S., Meena, K. K., & Yandigeri, M. (2017a). Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria. *3 Biotech*, 7(2), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0786-6>
- Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K., & Mohapatra, T. M. (2011). Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. *The Journal of Antibiotics*, 64(6), 401–412. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.21>
- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh V. P. & Prasad, S. M. (2017b). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 8(apr), 1–37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>
- Singh, S. C., Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, 41(4), 297–308. Retirado de <http://www1.nencki.gov.pl/pdf/ap/ap620.pdf> Acedido a: 25 de Agosto de 2018
- Skulberg, R., & Skulberg, M. (1990). *Forskning med Algekulturer NIVAs Kultursamling av Alger (Research with Algal Cultures. NIVA's Culture Collection of Algae)*. Norsk Institutt for Vannforskning. Oslo, Norway.

- Snodderly, D. M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1448S–1461S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1448S>
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D. (2015). Antioxidant Potential of Phycobiliproteins: Role in Anti-Aging Research. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4(2). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000172>
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Quintas, M. A. C., Ferreira, A. C. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5589–5594. <https://doi.org/10.1021/jf200999n>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J. & Codd, G. A. (2019). Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Archives of Toxicology* 93(9). 2429-2481. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
- Thajuddin, N., & Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89(1), 47–57. Retirado de <https://pdfs.semanticscholar.org/98e1/4c455aa390fa156350be3b4433421785fec1.pdf> Acedido a: 2 de Agosto de 2018
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Torres, P. B., Pires, J. S., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2017). Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. *Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo*. Retirado de http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=74&Itemid=98 Acedido a: 3 de Agosto de 2018
- Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R. S., Oshima, T., & Kokubo, K. (2014). Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using β -Carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials* (2014), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/802596>
- Usman, A., Khalid, S., Usman, A., Hussain, Z., & Wang, Y. (2017). Algal Polysaccharides, Novel

- Application, and Outlook. In K. M. Zia, M. Zuber, & M. Ali (Eds.), *Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Materials Science*. 115–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812360-7.00005-7>
- Vijayakumar, S., & Menakha, M. (2015). Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. *Journal of Acute Medicine*, 5(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., & Vega, J. M. (2011). Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319–333. <https://doi.org/10.3390/md9030319>
- Vincent, W. F. (2009). Cyanobacteria. In *Protists, bacteria and Fungi: Planktonic and attached*. 226–232. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env314>
- Vinogradova, O. N. (2016). Representatives of Stigonematales in the Flora of Ukraine: Diversity, Ecology, and Taxonomic Position. *International Journal on Algae*, 18(1), 67–80. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v18.i1.60>
- Visser, P. M., Ibelings, B. W., Bormans, M., & Huisman, J. (2016). Artificial mixing to control cyanobacterial blooms: a review. *Aquatic Ecology*, 50(3), 423–441. <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9537-0>
- Volkman, J. K. (2003). Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 495–506. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1172-8>
- Wada, H., & Murata, N. (1998). Membrane Lipids in Cyanobacteria. In P.-A. Siegenthaler & N. Murata (Eds.), *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. 65–81. https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5_4
- Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. *Microbiological Reviews*, 58(1), 94–144. Retirado de <https://mmbr.asm.org/content/mmbr/58/1/94.full.pdf> Acedido a: 25 de Outubro de 2019
- Walsby, A. E., Schanz, F., & Schmid, M. (2006). The Burgundy-blood phenomenon: A model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytologist*, 169(1), 109–122. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01567.x>
- Walsh, K., Jones, G. J., & Dunstan, R. H. (1997). Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Science*, 44(5), 825–831. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00573-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00573-0)
- Waterbury, J. B. (2006). The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. In S. K. S. E. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. (Ed.), *The Prokaryotes 4-Bacteri*, 1053–1073. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_38
- Whitton, Brian A. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (Whitton B.A., Ed.). 1-600. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wijeratne, S. S., Cuppett, S. L., & Schlegel, V. (2005). Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8768–8774. <https://doi.org/10.1021/jf060475v>
- Wong, T. H. F., & Brown, R. R. (2012). Engineering procedures for stormwater management in Tasmania. In *Water sensitive urban design*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511974304.026>
- Wu, L. C., Ho, J. A., Shieh, M. C., & Lu, I. W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of

- Spirulina and Chlorella water extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4207–4212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf0479517>
- Yasin, D., Zafaryab, M., Ansari, S., Ahmad, N., Khan, N. F., Zaki, A., ... Fatma, T. (2019). Evaluation of antioxidant and anti-proliferative efficacy of *Nostoc muscorum* NCCU-442. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.001>
- Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B. K., & Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106(3), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.006>
- Zeeshan, M., & Prasad, S. M. (2009). Differential response of growth, photosynthesis, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria. *South African Journal of Botany*, 75(3), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.03.003>
- Zeeshan, M., Suhail, S., Biswas, D., Farooqui, A., & Arif, J. M. (2010). Screening of Selected Cyanobacterial Strains for Phycochemical Compounds and Biological Activities in Vitro. *Biochemical and Cellular Archives*, 10(2), 163–168. Retirado de https://www.researchgate.net/profile/Alvina_Farooqui/publication/236014731_SCREENING_OF_SELECTED_CYANOBACTERIAL_STRAINS_FOR_PHYCOCHEMICAL_COMPOUNDS_AND_BIOLOGICAL_ACTIVITIES_IN_VITRO/links/0deec5281deddeee72000000.pdf
Acedido a: 26 de Junho de 2019

8. Anexos



ANEXO I – Poster de comunicação em forma de painel

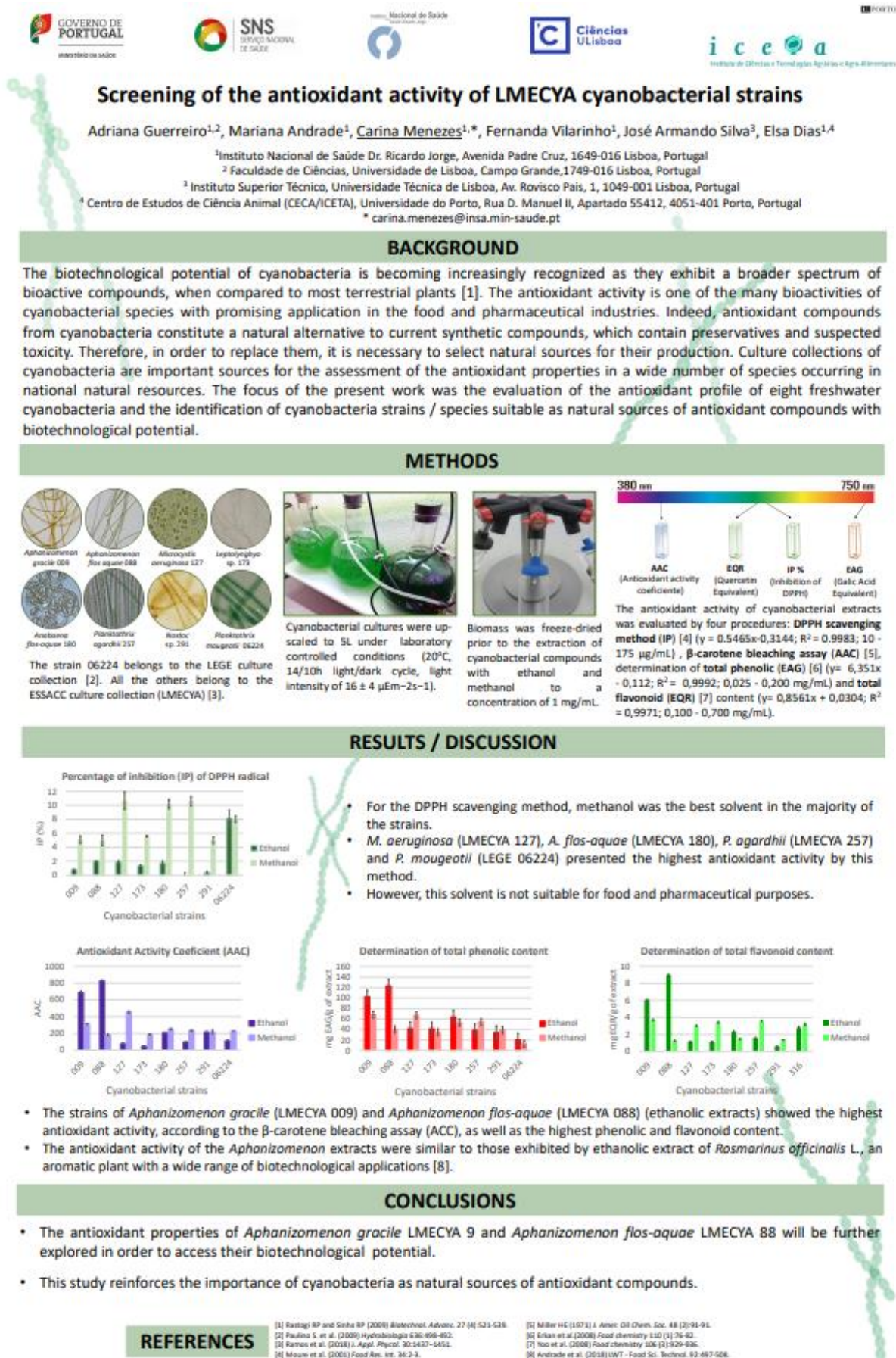


Figura 8.1 – Poster de comunicação em forma de painel

ANEXO II – Meio de cultura Z8 para cianobactérias

Tabela 8.1 – Composição do meio Z8 para cultura de cianobactérias (Skulberg & Skulberg, 1990).

Soluções <i>stock</i>	Composição	Concentração	Volume a preparar (mL)	Volume final (mL)
A	NaNO ₃	46,7 g/L	1000	1000
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5,9 g/L		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 g/L		
B	K ₂ HPO ₄	3,1 g/L	1000	1000
	Na ₂ CO ₃	2,1 g/L		
Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,8 g/L	100	1000
	EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	3,9 g/L		
Micronutrientes	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,330 g/100 mL	100	1000
	(NH ₄)MoO ₇ ·4H ₂ O	0,880 g/100 mL		
	KBr	1,20 g/100 mL		
	KJ	0,830 g/100 mL		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,87 g/100 mL		
	Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,55 g/100 mL		
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,46 g/100 mL		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,25 g/100 mL		
	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	1,98 g/100 mL		
	Cr(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,410 g/100 mL		
	V ₂ O ₅	0,089 g/L		
	Al ₂ (SO ₄) ₃ ·K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	4,74 g/100 mL		
	H ₃ BO ₃	3,10 g/L		
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23 g/100 mL		

Para a preparação da solução *stock* A e B, enche-se um balão volumétrico de 1L até cerca de 2/3 com água bidestilada e junta-se os respectivos componentes/reagentes previamente pesados e dissolve-se com a ajuda de um agitador magnético. Perfaz-se até aos 1000 mL com água bidestilada. Existem duas fases na preparação da solução *stock* Fe- EDTA. Primeiro prepara-se a solução de FeCl₃·6H₂O, enchendo um balão de 100 mL com água bidestilada até metade e adiciona-se 827 µL de HCL 37% e 2,8 gramas de FeCl₃·6H₂O e enche-se até ao risco com água bidestilada. Tapa-se e agita-se. Para a preparação da solução EDTA-Na₂·2H₂O, enche-se um balão de 100 mL com água bidestilada até metade e adiciona-se 10 µL de NaOH a 1M e 3,9 gramas de EDTA-Na₂·2H₂O. Perfaz-se até ao risco com água bidestilada e agita-se. No final, num balão de 1L, adiciona-se 10 mL da solução de FeCl₃·6H₂O e 9,5 mL da solução de EDTA-Na₂·2H₂O e perfaz-se até ao risco com água bidestilada e tapa-se e agita-se.

Para a solução *stock* de micronutrientes, prepara-se as soluções dos diferentes reagentes colocando 100 mL de água bidestilada num balão volumétrico de vidro ou proveta, que são usados para lavagem ao transferir os diferentes reagentes para um erlenmeyer de 100 mL. Tapa-se e agita-se. No caso da solução do reagente nº11, é necessário aquecer um pouco a solução e dissolver com a ajuda de um magneto e agitador magnético. A solução *stock* é preparada pela adição de 10 mL das soluções 1 a 12 e 100 mL da solução 13 a um balão de 1L e pela adição de água bidestilada até perfazer o risco. Todas as soluções *stock* são autoclavadas e as soluções utilizadas para fazer as mesmas são descartadas no final. O meio Z8 é preparado segundo as proporções apresentadas na tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Composição e concentração do meio de cultura Z8 para cianobactérias.

Meio de cultura Z8	
Soluções	Concentração
Solução <i>stock</i> A	10 mL/L
Solução <i>stock</i> B	10 mL/L
Solução <i>stock</i> Fe-EDTA	10 mL/L
Solução <i>stock</i> de micronutrientes	5 mL/L

ANEXO III – Resultados preliminares da extração das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224)

Tabela 8.3. – Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos etanólicos das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; IP – percentagem de inibição; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; ET – Equivalentes de Trolox).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (515 nm)	Média IP (%)	DP	CV (%)	Média ET(µg/mL)	DP	CV (%)
Branco	-	0,3844	-	-	-	-	-	-
		0,3846						
		0,3847						
LMECYA 009	5	0,5739	-46,44	2,58	-5,56	-86,43	4,26	-4,93
		0,5543						
		0,5613						
	3	0,4471	-15,84	1,22	-7,73	-28,05	2,25	-8,02
		0,4402						
		0,4492						
	1	0,3814	0,80	0,04	4,61	2,54	0,07	2,66
		0,3816						
		0,3844						
LMECYA 088	5	0,4657	-20,94	0,49	-2,33	-37,07	0,91	-2,46
		0,4666						
		0,4630						
	3	0,4129	-6,46	1,47	-22,69	-10,79	2,69	-24,96
		0,4124						
		0,4029						
	1	0,3769	2,01	0,02	0,92	4,77	0,03	0,71
		0,3794						
		0,3768						
LEGE 06224	5	0,3082	18,84	0,89	4,72	36,25	1,89	5,22
		0,3144						
		0,3138						
	1	0,3500	8,87	0,12	1,32	17,38	0,22	1,24
		0,3509						
		0,3505						

Tabela 8.4. - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em fenólicos dos extratos etanólicos das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; EAG – Equivalentes de Ácido Gálico; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (725 nm)	Média EAG (mg/mL)	DP	CV (%)	Média EAG (mg/g extrato)	DP	CV (%)
LMECYA 009	5	2,4374	0,381	0,0	4,8	76,1	3,6	4,8
		2,2612						
		2,2189						
	3	1,5292	0,247	0,0	4,1	82,2	3,4	4,1
		1,4212						
		1,4147						
	1	0,5162	0,102	0,0	3,0	102,3	3,0	3,0
		0,5533						
		0,544						
LMECYA 088	5	1,9612	0,314	0,0	3,6	62,7	2,3	3,6
		1,8501						
		1,8266						
	3	1,2962	0,212	0,0	3,9	70,8	2,7	3,9
		1,2001						
		1,2139						

	1	0,7001	0,123	0,0	3,3	123,2	4,1	3,3
		0,6572						
		0,6533						
LEGE 06224	5	0,8444	0,152	0,0	3,0	30,5	0,9	3,0
		0,8894						
		0,8355						
	1	0,288	0,061	0,0	2,7	61,1	1,6	2,7
		0,269						
		0,2715						

Tabela 8.5. - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides dos extratos etanólicos das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; EQR – Equivalentes de Quercetina; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (510 nm)	Média (mg EQR/mL)	DP	CV (%)	Média EQR (mg/g extrato)	DP	CV (%)
LMECYA 009	5	2,2361	2,380	0,2	7,2	476,1	34,1	7,2
		1,97						
		1,9989						
	3	1,5375	1,702	0,1	4,3	567,3	24,2	4,3
		1,5069						
		1,4178						
	1	0,5519	0,606	0,0	0,8	605,6	4,7	0,8
		0,5443						
		0,5503						
LMECYA 088	5	1,9067	2,116	0,1	4,0	423,3	16,9	4,0
		1,8557						
		1,7641						
	3	1,3634	1,563	0,0	0,4	521,2	1,9	0,4
		1,3717						
		1,3716						
	1	0,8057	0,901	0,0	0,5	900,6	4,4	0,5
		0,7994						
		0,7991						
LEGE 06224	5	1,0558	1,198	0,0	0,0	239,6	0,0	0,0
		1,0557						
		1,056						
	1	0,27	0,283	0,0	1,9	283,6	5,5	1,9
		0,2781						
		0,2699						

Tabela 8.6. - Resultados do ensaio do branqueamento do β -caroteno dos extratos etanólicos das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; R. – réplica; AAC – coeficiente de atividade antioxidante; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação)

Amostra		Abs (470 nm) 0 min			Média (AAC)	DP	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
Branco	-	0,5945	0,5958	0,5906			
Amostra	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (470 nm) 120 min			Média (AAC)	DP	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
Branco	-	0,1113	0,1101	0,1144	0,11	0,00	1,98
LMECYA 009	5	1,2647	1,208	1,2276	2328,21	59,78	2,57
	3	0,9092	0,8801	0,8895	1621,34	30,83	1,90
	1	0,4492	0,4378	0,4466	690,47	12,40	1,80
LMECYA 088	5	1,248	1,2498	1,2813	2382,74	38,88	1,63
	3	0,8749	0,8781	0,8913	1597,47	18,05	1,13

	1	0,5141	0,5065	0,5131	828,94	8,57	1,03
LEGE 06224	5	0,3234	0,3383	0,3358	457,89	16,56	3,62
	1	0,1633	0,1665	0,1709	114,11	7,92	6,94

ANEXO IV – Resultados preliminares da extração das estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291)

Tabela 8.7 - Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos metanólicos das estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; IP – percentagem de inibição; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; ET – Equivalentes de Trolox).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (515 nm)	Média IP (%)	DP	CV (%)	Média ET (µg/mL)	DP	CV (%)
Branco	-	0,3768	-	-	-	-	-	-
		0,3753						
		0,3759						
LMECYA 127	5	0,2946	21,52	0,49	2,28	40,65	0,90	2,22
		0,2935						
		0,2971						
	3	0,3032	20,12	0,65	3,24	38,06	1,20	3,15
		0,299						
		0,2989						
	1	0,3375	10,03	0,20	2,00	19,51	0,37	1,89
		0,3384						
		0,339						
LMECYA 173	5	0,3201	15,16	1,11	7,30	28,95	2,03	7,03
		0,3225						
		0,3144						
	3	0,3181	14,81	0,75	5,09	28,31	1,39	4,90
		0,3235						
		0,3193						
	1	0,3449	7,93	0,39	4,94	15,65	0,72	4,60
		0,3478						
		0,3459						
LMECYA 291	5	0,323	14,19	0,37	2,60	27,17	0,68	2,50
		0,3211						
		0,3238						
	3	0,3364	10,93	0,62	5,70	21,17	1,15	5,41
		0,3322						
		0,3361						
	1	0,3561	5,06	0,31	6,16	10,38	0,57	5,52
		0,3565						
		0,3583						

Tabela 8.8 - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em fenólicos dos extratos metanólicos das estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; EAG – Equivalentes de Ácido Gálico; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (725 nm)	Média EAG (mg/mL)	DP	CV (%)	Média EAG (mg/g de extrato)	DP	CV (%)
LMECYA 127	5	1,4026	0,2375	0,00	0,39	47,50	0,19	0,39
		1,3908						
		1,3961						
	3	0,8637	0,1554	0,00	2,35	51,81	1,21	2,35
		0,8598						
		0,9017						
	1	0,2947	0,0671	0,00	3,95	67,07	2,65	3,95
		0,3259						
		0,3213						
LMECYA 173	5	0,6603	0,1222	0,00	0,43	24,44	0,10	0,43
		0,6657						
		0,6663						
	3	0,3928	0,0801	0,00	0,78	26,69	0,21	0,78
		0,3958						
		0,4007						
	1	0,1405	0,0401	0,00	0,97	40,08	0,39	0,97
		0,1453						
		0,1419						
LMECYA 291	5	0,7202	0,1321	0,00	1,20	26,42	0,32	1,20

		0,7219						
		0,7384						
		0,4116						
	3	0,4162	0,0828	0,00	0,44	27,61	0,12	0,44
		0,4145						
		0,1371						
	1	0,1386	0,0390	0,00	1,56	39,00	0,61	1,56
		0,1313						

Tabela 8.9. - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides dos extratos metanólicos das estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; EQR – Equivalentes de Quercetina; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Amostras	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (510 nm)	Média EQR (mg/mL)	DP	CV (%)	Média EQR (mg/g extrato)	DP	CV (%)
LMECYA 127	5	1,1497	1,3085	0,01	0,39	261,70	1,03	0,39
		1,1467						
		1,1554						
	3	0,7075	0,7996	0,02	2,64	266,52	7,04	2,64
		0,7355						
		0,7017						
	1	0,2828	0,2983	0,00	1,04	298,33	3,09	1,04
		0,2868						
		0,2878						
LMECYA 173	5	1,2246	1,3960	0,01	0,61	279,20	1,72	0,61
		1,2187						
		1,2333						
	3	0,7181	0,7994	0,00	0,42	266,47	1,12	0,42
		0,713						
		0,7132						
	1	0,329	0,3502	0,01	2,11	350,15	7,40	2,11
		0,337						
		0,3245						
LMECYA 291	5	0,8542	0,9564	0,03	3,18	191,29	6,09	3,18
		0,8724						
		0,821						
	3	0,4725	0,5305	0,02	2,88	176,85	5,10	2,88
		0,4828						
		0,4985						
	1	0,1446	0,1329	0,00	3,19	132,85	4,23	3,19
		0,1403						
		0,1475						

Tabela 8.10. - Resultados do ensaio do branqueamento do β -caroteno dos extratos metanólicos das estirpes *M. aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173) e *Nostoc sp.* (LMECYA 291) com diferentes concentrações de extratos (1, 3 e 5 mg/mL). (Abs – absorvância; R. – réplica; AAC – coeficiente de atividade antioxidante; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Amostra		Abs (470 nm) 0 min			Média (AAC)	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
Branco	-	0,6167	0,6366	0,6292			
Amostra	Concentração do extrato (mg/mL)	Abs (470 nm) 120 min			Média (AAC)	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
Branco	-	0,2608	0,269	0,2656	0,27	0,00	0,90
LMECYA 127	5	0,8314	0,8188	0,7981	1527,20	46,79	3,06
	3	0,6354	0,6109	0,6063	974,63	43,53	4,47
	1	0,4276	0,4319	0,4342	456,19	9,32	2,04
LMECYA 173	5	0,9097	0,9267	0,9782	1866,98	99,26	5,32
	3	0,7653	0,7494	0,7535	1360,14	22,97	1,69
	1	0,5077	0,5168	0,5055	675,39	16,67	2,47
	5	0,4922	0,5008	0,4905	632,25	15,37	2,43

LMECYA 291	3	0,4115	0,4103	0,4105	399,24	1,79	0,45
	1	0,3456	0,3525	0,3494	227,82	9,62	4,22

ANEXO V – Resultados dos extratos etanólicos e metanólicos das estirpes cianobacterianas em concentração de 1 mg/mL

Tabela 8.11 - Resultados do ensaio do sistema de inibição do radical DPPH dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (Abs – absorvância; IP – percentagem de inibição; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação; ET – Equivalentes de Trolox).

Solvente	Amostras	Abs (515 nm)	Média Abs	DP	CV (%)	Média IP (%)	DP	CV (%)	Média ET (µg/mL)	DP	CV (%)
Etanol	Branco	0,3844	0,3846	0,00	0,04	-	-	-	-	-	-
		0,3846									
		0,3847									
	LMECYA 009	0,3814	0,3825	0,00	0,44	0,80	0,04	4,61	2,54	0,07	2,66
		0,3816									
		0,3844									
	LMECYA 088	0,3769	0,3777	0,00	0,39	2,01	0,02	0,92	4,77	0,03	0,71
		0,3794									
		0,3768									
	LEGE 06224	0,3500	0,3505	0,00	0,13	8,87	0,12	1,32	17,38	0,22	1,24
		0,3509									
		0,3505									
	Branco	0,3733	0,3754	0,00	0,65	-	-	-	-	-	-
		0,3781									
		0,3748									
	LMECYA 127	0,3698	0,3682	0,00	0,55	1,61	0,17	10,52	4,04	0,31	7,71
		0,3689									
		0,3659									
	LMECYA 173	0,3707	0,3711	0,00	0,32	1,33	0,11	8,49	3,53	0,21	5,89
		0,3724									
		0,3701									
	LMECYA 180	0,3702	0,3697	0,00	0,14	1,53	0,13	8,78	3,89	0,25	6,34
		0,3696									
		0,3692									
	LMECYA 257	0,3785	0,3789	0,00	0,50	-0,92	0,50	54,15	-0,62	0,92	148,21
		0,3809									
		0,3772									
	LMECYA 291	0,3745	0,3707	0,00	0,88	1,74	0,13	7,56	4,29	0,24	5,66
		0,3692									
		0,3685									
Metanol	Branco	0,4025	0,4034	0,00	0,21	-	-	-	-	-	-
		0,4042									
		0,4035									
	LMECYA 009	0,3814	0,3815	0,00	0,03	5,43	0,02	0,46	11,08	0,03	0,29
		0,3816									
		0,3815									
	LMECYA 088	0,381	0,3826	0,00	0,66	5,16	0,63	12,20	10,26	1,45	14,13
		0,3812									
		0,3855									
	LMECYA 180	0,3648	0,3623	0,00	0,73	10,20	0,66	6,46	19,82	1,21	6,11
		0,3595									
		0,3625									
	LMECYA 257	0,3637	0,3607	0,00	0,76	10,59	0,68	6,39	20,55	1,25	6,06
		0,3584									
		0,3599									
	LEGE 06224	0,3627	0,3678	0,00	1,26	8,82	1,14	12,97	17,30	2,10	12,17
		0,369									
		0,3717									
	Branco	0,3768	0,3760	0,00	0,20	-	-	-	-	-	-
		0,3753									
		0,3759									
	LMECYA 127	0,3305	0,3360	0,00	1,41	10,65	1,26	11,85	20,65	2,32	11,23
		0,3384									
		0,339									
	LMECYA 173	0,3449	0,3462	0,00	0,43	7,93	0,39	4,94	15,65	0,72	4,60
		0,3478									

		0,3459									
	LMECYA 291	0,3561	0,3573	0,00	0,49	4,97	0,46	9,32	10,22	0,85	8,34
		0,3565									
		0,3593									

Tabela 8.12 - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em fenólicos dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (Abs – absorvância; EAG – Equivalentes de Ácido Gálico; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Solvente	Amostras	Abs (725 nm)	Média EAG (mg/mL)	DP	CV (%)	Média EAG (mg/g extrato)	Desvio Padrão	CV (%)
Etanol	LMECYA 009	0,5162	0,102	0,0	3,0	102,3	3,0	3,0
		0,5533						
		0,544						
	LMECYA 088	0,7001	0,123	0,0	3,3	123,2	4,1	3,3
		0,6572						
		0,6533						
	LMECYA 127	0,1567	0,0416	0,00	1,41	41,64	0,59	1,41
		0,1498						
		0,1508						
	LMECYA 173	0,1481	0,0414	0,00	1,18	41,43	0,49	1,18
		0,1543						
		0,1509						
	LMECYA 180	0,2934	0,0637	0,00	0,19	63,72	0,12	0,19
		0,2919						
		0,2927						
	LMECYA 257	0,1360	0,0385	0,00	1,45	38,46	0,56	1,45
		0,1290						
		0,1317						
	LMECYA 291	0,1031	0,0342	0,00	0,99	34,22	0,34	0,99
		0,1074						
		0,1055						
	LEGE 06224	0,288	0,061	0,0	2,7	61,1	1,6	2,7
		0,269						
		0,2715						
Metanol	LMECYA 009	0,3170	0,0681	0,00	0,83	68,07	0,56	0,83
		0,3241						
		0,3199						
	LMECYA 088	0,1487	0,0403	0,00	2,22	40,25	0,89	2,22
		0,1375						
		0,1447						
	LMECYA 127	0,2947	0,0671	0,00	3,95	67,07	2,65	3,95
		0,3259						
		0,3213						
	LMECYA 173	0,1063	0,0349	0,00	1,49	34,90	0,52	1,49
		0,1129						
		0,1098						
	LMECYA 180	0,2217	0,0531	0,00	1,16	53,09	0,61	1,16
		0,2294						
		0,2245						
	LMECYA 257	0,2299	0,0546	0,00	1,29	54,58	0,70	1,29
		0,2388						
		0,2352						
	LMECYA 291	0,1371	0,0390	0,00	1,56	39,00	0,61	1,56
		0,1386						
		0,1313						
	LEGE 06224	0,1351	0,0387	0,00	0,47	38,70	0,18	0,47
		0,1329						
		0,1334						

Tabela 8.13 - Resultados do ensaio da determinação do conteúdo total em flavonóides dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (Abs – absorvância; EQR – Equivalentes de Quercetina; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Solvente	Amostras	Abs (510 nm)	Média EQR (mg/mL)	DP	CV (%)	Média EQR (mg/g extrato)	DP	CV (%)
Etanol	LMECYA 009	0,5529	0,606	0,0	1,0	605,6	5,8	1,0
		0,5433						
		0,5503						
	LMECYA 088	0,8057	0,901	0,0	0,5	900,6	4,4	0,5
		0,7994						
		0,7991						
	LMECYA 127	0,2256	0,2296	0,00	0,62	229,65	1,42	0,62
		0,2276						
		0,2278						
	LMECYA 173	0,2168	0,2189	0,00	0,70	218,94	1,52	0,70
		0,2193						
		0,2174						
	LMECYA 180	0,2286	0,2332	0,00	1,02	233,23	2,39	1,02
		0,2324						
		0,2292						
	LMECYA 257	0,1711	0,1621	0,00	2,15	162,05	3,49	2,15
		0,1706						
		0,1657						
	LMECYA 291	0,1355	0,1197	0,00	2,93	119,69	3,50	2,93
		0,1335						
		0,1296						
	LEGE 06224	0,27	0,284	0,0	2,5	283,7	7,0	2,5
		0,2801						
		0,2696						
Metanol	LMECYA 009	0,3510	0,3713	0,00	0,90	371,34	3,34	0,90
		0,3453						
		0,3486						
	LMECYA 088	0,1428	0,1277	0,00	2,79	127,75	3,56	2,79
		0,1367						
		0,1398						
	LMECYA 127	0,2828	0,2983	0,00	1,04	298,33	3,09	1,04
		0,2868						
		0,2878						
	LMECYA 173	0,3320	0,3426	0,01	2,83	342,56	9,70	2,83
		0,3154						
		0,3236						
	LMECYA 180	0,1623	0,1513	0,01	3,39	151,35	5,13	3,39
		0,1627						
		0,1549						
	LMECYA 257	0,3422	0,3627	0,00	0,78	362,69	2,83	0,78
		0,3381						
		0,3424						
	LMECYA 291	0,1446	0,1329	0,00	3,19	132,85	4,23	3,19
		0,1403						
		0,1475						
	LEGE 06224	0,3005	0,3117	0,01	1,99	311,68	6,21	1,99
		0,2911						
		0,3001						

Tabela 8.14 - Resultados do ensaio do branqueamento do β -caroteno dos extratos etanólicos e metanólicos a concentração de 1mg/ mL das estirpes *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Leptolyngbya sp.* (LMECYA 173), *Anabaena flos-aquae* (LMECYA 180), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Nostoc sp.* (LMECYA 291) e *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224) (Abs – absorvância; R. – réplica; AAC – coeficiente de atividade antioxidante; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação).

Solvente	Amostra	Abs (470 nm) 0 min			Média Abs	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
Etanol	Branco	0,5551	0,5741	0,5645	0,5646	0,01	1,68
	Amostra	Abs (470 nm) 120 min			Média AAC	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,1823	0,1825	0,1822	0,1823	0,00	0,08
	LMECYA 127	0,2153	0,2122	0,2105	79,36	6,37	8,02
	LMECYA 173	0,2824	0,2817	0,2822	261,01	0,94	0,36
	LMECYA 180	0,3268	0,3317	0,3288	383,97	6,45	1,68
	LMECYA 257	0,2963	0,2959	0,2978	299,12	2,62	0,88
	LMECYA 291	0,2647	0,2666	0,2654	217,76	2,51	1,15
	Amostra	Abs (470 nm) 0 min			Média Abs	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,5945	0,5958	0,5906	0,5936	0,00	0,46
	Amostra	Abs (470 nm) 120 min			Média AAC	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,1113	0,1101	0,1144	0,11	0,00	1,98
	LMECYA 009	0,4492	0,4378	0,4466	690,47	12,40	1,80
	LMECYA 088	0,5141	0,5065	0,5131	828,94	8,57	1,03
	LEGE 06224	0,1633	0,1665	0,1709	114,11	7,92	6,94
Metanol	Amostra	Abs (470 nm) 0 min			Média Abs	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,5683	0,5594	0,5548	0,5608	0,01	1,22
	Amostra	Abs (470 nm) 120 min			Média AAC	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,2655	0,2711	0,2689	0,2685	0,00	1,05
	LMECYA 009	0,3607	0,3599	0,361	314,82	1,95	0,62
	LMECYA 088	0,3235	0,3198	0,3228	183,12	6,72	3,67
	LMECYA 173	0,3241	0,3233	0,3229	187,91	2,09	1,11
	LMECYA 180	0,344	0,3399	0,3425	251,88	7,10	2,82
	LMECYA 257	0,3388	0,3356	0,3367	234,44	5,56	2,37
	LEGE 06224	0,3356	0,3347	0,3352	228,05	1,54	0,68
	Amostra	Abs (470 nm) 0 min			Média Abs	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,6167	0,6366	0,6292	0,62665	0,01	2,25
	Amostra	Abs (470 nm) 120 min			Média AAC	DV	CV (%)
		R. A	R. B	R. C			
	Branco	0,2608	0,269	0,2656	0,27	0,00	0,90
	LMECYA 127	0,4276	0,4319	0,4342	456,19	9,32	2,04
	LMECYA 291	0,3466	0,3432	0,3444	215,48	4,80	2,23